

THERMODYNAMISCHE, REAKTIONSKINETISCHE UND
SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MOPC 104E IGM,
EINEM HOMOGENEN MAKRO-IMMUNGLOBULIN
MIT α -(1-3)-DEXTRAN-SPEZIFITÄT

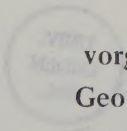
Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Georg Schepers
aus Aachen

1978

**THERMODYNAMISCHE, REAKTIONSKINETISCHE UND
SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MOPC 104E IGM,
EINEM HOMOGENEN MAKRO-IMMUNGLOBULIN
MIT α -(1-3)-DEXTRAN-SPEZIFITÄT**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.**

 **vorgelegt von
Georg Schepers
aus Aachen**

1978

Dekan: Prof. Dr. Horst Rimpler

Leiter der Arbeit: Prof. Dr. Otto Westphal

Referent: Prof. Dr. Otto Westphal

Korreferent: Prof. Dr. Jochen Lehmann

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:

2. Nov. 1978

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Himmelspace, K., Geyer, H., Hoyer, G. und Schepers, G., (1977)
FEBS-Letters, 75, 154-158

Preparation of ^{125}I -labelled Oligosaccharide Derivatives with
the aid of 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic Acid N-Hydroxysuccin-
imide Ester.

Schepers, G., Blatt, Y., Himmelspace, K. und Pecht, I., (1978)
Biochemistry, 17, 2239-2245

Binding Site of a Dextran-Specific Homogeneous IgM:
Thermodynamic and Spectroscopic Mapping by Dansylated Oligo-
saccharides.



Fezi und Marianne
gewidmet

Mein Dank gilt besonders

- Prof. Dr. Otto Westphal, unter dessen Leitung diese Dissertation stand, für sein wohlwollendes Interesse und Förderung dieser Arbeit.
- Dr. Karl Himmelspace, der diese Dissertation betreute, für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die ich jederzeit in Anspruch nehmen konnte.
- Dr. Theodor Funck (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen) sowie Prof. Dr. Israel Pecht (Weizmann-Institute of Science in Rehovot/Israel) für deren Interesse an dieser Dissertation und die herzliche Aufnahme als Gast in ihren Arbeitsgruppen. Diese Gastaufenthalte waren für mich sehr lehrreich, da sie mich mit neueren physikalisch-chemischen Methoden vertraut machten, und ermöglichten die Durchführung der physikalisch-chemischen Messungen.
- Dr. Doron Lancet und - insbesondere - Yoav Blatt für ihr Engagement und ihre Hilfe, die vor allem bei der Auswertung der Daten aus den Temperatursprung-Experimenten unerlässlich war.
- Dr. Ari Gafni für die Durchführung der CPL-Messungen.
- Rafi Zidovetzki für die kalorimetrische Bestimmung von Reaktionsenthalpien.
- Rudolf Borowiak und Dr. Siegfried Schlecht für das Züchten von *Aspergillus niger*.
- Helga Kochanowski für die Messungen in der analytischen Ultrazentrifuge.
- Gudrun Hoyer für ihre wertvolle Hilfe, insbesondere bei der Serumgewinnung und *invivo*-Passage von MOPC 104E Plasmacytom.
- der MPG für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation sowie EMBO und MINERVA für die Finanzierung der Gastaufenthalte am Weizmann-Institute of Science in Rehovot.

Bei allen bereits genannten sowie hier nicht namentlich erwähnten Kollegen und Freunden, die durch anregenden Diskussionen und Hilfeleistungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich herzlich.

Inhaltsverzeichnis:	Seite:
A EINLEITUNG	1
B EXPERIMENTELLER TEIL	12
B-1 Materialien	12
B-1.1 Bezugsquellen	12
B-1.2 Puffer und Lösungen	13
B-2 Gewinnung, Charakterisierung und Derivatisierung von Oligosaccharid-Haptenen	14
B-2.1 Reinigung, Nachweis und Analyse	14
B-2.1.1 Papierchromatographie	14
B-2.1.2 Papierelektrophorese	14
B-2.1.3 Dünnschichtchromatographie	15
B-2.1.4 Färbemethoden auf Dünnschichtplatten und Papier	15
Reagenz auf Kohlenhydrate	15
Reagenz auf primäre Amine	15
Reagenz auf Phenole	16
B-2.1.5 Gelchromatographie	16
B-2.1.6 Analytische Nachweismethoden	16
Anthrone-Test auf reduzierende Monosaccharideinheiten	16
Fluram-Test auf primäre Amine	17
Willstätter-Schudel Bestimmung von reduzierenden Gruppen	18
B-2.1.7 Optische Analysenmethoden	18
Polarimetrie	18
UV-Spektroskopie	19
Fluoreszenz-Spektroskopie	19
IR-Spektroskopie	19
B-2.2 Präparative Methoden	19
B-2.2.1 Herstellung der Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe	19
Züchten von <i>Aspergillus niger</i>	19
Isolierung der Zellwand-Polysaccharide	20
Saure Partialhydrolyse von α -(1-3)-Glucan	22
Probehydrolyse	22
Präparative Partialhydrolyse	22
Isolierung der Oligosaccharide mittels Adsorptionschromatographie	22
Präparation einer Kohle-Celite-Säule	22
Chromatographie des Partialhydrolysats	22
Reinigung der Oligosaccharide	23

B-2.2.2 Herstellung von Oligosaccharid-Derivaten	23
Reduktion zu den Alditolen	23
Herstellung von ³ H-markierten Alditolen	24
Herstellung von 1-Amino-1-desoxy-alditolen	24
Über das Oxim mit anschließender	
katalytischer Hydrierung	24
Oximherstellung	24
Katalytische Reduktion des Oxims	24
Mittels reduktiver Aminierung	25
Reduktive Aminierung mit Di-	
methylaminoboran	25
Reduktive Aminierung mit	
Natrium-Cyanoborhydrid	25
Anmerkungen	25
Herstellung von Aldonsäuren	25
Herstellung von 4-Hydroxyphenyl-Derivaten	26
Aus Aldonsäuren	26
Herstellung von N4-CME	26
Umsetzung von N4-CME mit Tyramin	26
Aus 1-Amino-1-desoxy-alditolen	26
Acylierung von N4-CH ₂ NH ₂ mit	
HPPE zum N4-HPPA	26
Radiojodierung von N4-HPPA	27
Herstellung von Dansylhydrazonen	27
B-3 Gewinnung, Isolierung und Charakterisierung von MOPC 104E IgM	28
B-3.1 Gewinnung und Isolierung von MOPC 104E IgM	28
B-3.1.1 Transplantation von Plasmacytom MOPC 104E in BALB/c Mäuse	28
Passage von Spender- auf Empfängertiere	28
Einfrieren von Tumorzellen	29
Passage aus eingefrorenen Tumorzellen	29
Anmerkungen	30
B-3.1.2 Blutentnahme und Serumgewinnung	30
B-3.1.3 Isolierung von MOPC 104E IgM	30
Herstellung von Immunadsorbens Sepharose 2B-	
-BSA-B1355S	30
Partielle Oxidation von Dextran B1355S	30
Bromcyan-Aktivierung von Sepharose 2B	31
Bekuppeln der BrCN-aktivierten Sepha-	
rose mit BSA	31
Bereitung des Adsorbens	31
Affinitätschromatographie an Sepharose 2B-	
-BSA-B1355S	31
B-3.1.4 Handhabung von MOPC 104E IgM-Lösungen	32
Aufbewahren der Proteinlösung	32
Umpuffern	32
Konzentrieren der Proteinlösung	32
Mit Überdruck	32
Mit Unterdruck	33
Durch Resorption von Puffer	33
Durch Präzipitation	33

B-3.2 Charakterisierung von MOPC 104E IgM	33
B-3.2.1 Physikalische Methoden	33
Konzentrationsbestimmung	33
Extinktionsmessung	33
Folin-Test	34
Bestimmung der Sedimentationskonstanten	34
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
PAGE in SDS-Flachgelen	34
Mikro-Disk-PAGE	35
Gelchromatographie	35
B-3.2.2 Immunologische Methoden	35
Quantitativer Immunadsorbenstest	35
Immunoelektrophorese	36
Gleichgewichtsdialyse mit N4-HPPA ^{125J}	36
Bindungstest nach Farr	36
B-4 Methoden zur Untersuchung des Hapten-Antikörper-Komplexes	37
B-4.1 Statische Untersuchungen	37
B-4.1.1 Gleichgewichtsmessungen	37
Gleichgewichtsdialyse	37
Verdrängungs-Gleichgewichtsdialyse	38
Fluorimetrische Titrationsen	38
B-4.1.2 Bestimmung von Fluoreszenzeigenschaften der gebundenen Hapten	39
Fluoreszenzspektroskopie	39
Linearpolarisation der Fluoreszenz	39
Zirkularpolarisation der Fluoreszenz	41
B-4.2 Kinetische Untersuchungen	41
B-4.2.1 Reaktionskinetische Messungen mit dem Fluoreszenz-Temperatursprung-Verfahren	41
B-5 Methoden zur Untersuchung thermisch induzierter Zustandsänderungen von MOPC 104E IgM	44
B-5.1 Optische Methoden	44
B-5.1.1 Temperaturdifferenzspektroskopie der UV-Absorption	44
B-5.1.2 Zirkulardichroismus	45
B-5.1.3 Optische Rotation	46
B-5.1.4 Fluoreszenzspektroskopie	47
B-5.2 Kalorimetrische Methoden	48
B-5.2.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie	50
B-5.2.2 Kalorimetrie nach der Methode der abgeglichenen Wärmepulse	50

C HAUPTTEIL

- C-1 Zur Gewinnung, Charakterisierung und Derivatisierung von Oligosaccharid-Haptenen
 - C-1.1 Gewinnung von α -(1-3)-Glucan
 - C-1.2 Herstellung der Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe
 - C-1.3 Charakterisierung von Poly- und Oligosacchariden
 - Zur Beziehung zwischen Polymerisationsgrad und molekularem Drehwert
 - Zur Beziehung zwischen Polymerisationsgrad und R_f -Wert
 - Zusammenfassende Übersicht
 - C-1.4 Derivate der Oligosaccharide
 - 1-Amino-1-desoxy-alditole
 - Aldonsäuren und deren Aktivierung
 - Radioaktive Markierung von Oligosacchariden
 - Fluoreszenz-Markierung von Oligosacchariden
- C-2 Zur Gewinnung, Isolierung und Charakterisierung von MOPC 104E IgM
 - C-2.1 Transplantation von MOPC 104E in BALB/c Mäuse
 - C-2.2 Isolierung von MOPC 104E IgM
 - C-2.3 Kapazitätsbestimmung des Immunadsorbens
 - Maximalkapazität der Adsorbenssäule
 - Quantitativer Immunadsorbenstest
 - C-2.4 Charakterisierung des isolierten IgM
 - Gelchromatographie
 - Sedimentationsverhalten
 - Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 - Immunelektrophorese
 - Hapten-Bindungstest
 - Thermische Beständigkeit von MOPC 104E IgM
 - Zusammenfassende Übersicht
 - C-2.5 Hinweise zum Umgang mit MOPC 104E IgM in Lösung
- C-3 Untersuchung des Hapten-Antikörper-Komplexes
 - C-3.1 Statische Untersuchungen
 - C-3.1.1 Gleichgewichtsmessungen
 - Zur Methode der Gleichgewichtsmessungen allgemein
 - Zur Gleichgewichtsdialyse
 - Zur Verdrängungs-Gleichgewichtsdialyse
 - Zur fluorimetrischen Titration
 - Zur Auswertung des Quenches der "intrinsic" Proteinfluoreszenz für Gleichgewichtsmessungen

Auswertung in der Praxis	91
Ergebnisse aus Gleichgewichtsdialysen	96
Ergebnisse der Verdrängungs-Gleichgewichtsdialyse	97
Ergebnisse aus fluorimetrischen Titrationsen	98
C-3.1.2 Fluoreszenzeigenschaften der gebundenen Hapten	102
Zur Methode der Linearpolarisation	102
Zur Methode der Zirkularpolarisation	103
Ergebnisse aus der Fluoreszenzspektroskopie	104
Ergebnisse aus Linearpolarisationsmessungen	105
Ergebnisse aus Zirkularpolarisationsmessungen	105
C-3.1.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse	106
C-3.2 Kinetische Untersuchungen	114
C-3.2.1 Reaktionskinetik	114
Zur Methode des Fluoreszenz-Temperatursprung-Verfahrens	114
Zur Auswertung der Relaxationsspektren	115
Ergebnisse und Diskussion	118
C-4 Untersuchung thermisch induzierbarer Zustandsänderungen von MOPC 104E IgM	129
C-4.1 Optische Methoden	129
Ergebnisse aus der Temperaturdifferenz-UV-Spektroskopie	129
Ergebnisse aus den Messungen des Zirkulardichroismus	131
Ergebnisse aus den Messungen der optischen Rotation	132
Ergebnisse aus der Fluoreszenzspektroskopie	133
C-4.2 Mikrokalorimetrische Messungen	134
Zur Methode der Differential-Scanning-Kalorimetrie	134
Zur Kalorimetrie nach der Methode der abgeglichenen Wärmepulse	135
Ergebnisse aus DSC und BHPC	136
C-4.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse	138
D ZUSAMMENFASSUNG	142
E LITERATURVERZEICHNIS	144

Verzeichnis der Abkürzungen:

B1355S	Dextran-Fraktion S aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL 1355
BHPC	Kalorimetrie nach der Methode der abgeglichenen Wärmeimpulse (balanced heat pulse calorimetrie)
BSA	Rinder-Serum-Albumin
BSB	Borat-gepufferte Kochsalzlösung (vgl. B-1.2, S.13)
ByG	Rinder-Gammaglobulin
CD	Zirkulardichroismus
CPL	Zirkularpolarisation der Lumineszenz (Fluoreszenz)
DMAB	Dimethylaminoboran
DMF	N,N-Dimethyformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenyl-
Dns (=Dansyl-)	5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-
DSC	Differential-Scanning-Kalorimetrie
Gly/HCl	0,1 m Glycin-HCl-gepufferte Kochsalzlösung (vgl. B-1.2, S.13)
HPPE	3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure-N-succinimidester
IM2	Isomaltose (α -D-Glcp-(1-6)- α -D-Glcp)
IM3, IM4, usw.	das entsprechende Tri-, Tetrasaccharid usw.
MW	Molekulargewicht
N2-CHO	Nigerose (α -D-Glcp-(1-3)- α -D-Glcp)
N3-CHO, N4-CHO usw.	das entsprechende Tri-, Tetrasaccharid usw. aus der Reihe des α -(1-3)-Glucans
N4A-CHO	α -D-Glcp-(1-3)- α -D-Glcp-(1-4)- α -D-Glcp-(1-3)- α -D-Glcp
N4-CH ₂ NH ₂	1-Amino-1-desoxy-alditol von N4-CHO
N3-CH ₂ OH, N4-CH ₂ OH usw.	Alditole von N3-CHO, N4-CHO usw.
N4-COOH	Aldonsäure von N4-CHO
N4-CME	Cyanmethylester von N4-COOH
N3-Dns, N4-Dns usw.	Dansylhydrazone von N3-CHO, N4-CHO usw.
N4-HPPA	1-(3-(4-Hydroxyphenyl-)propionyl-)amido-1-desoxy-alditol von N4-CHO
N4-Tyr	Tyramid von N4-COOH
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (vgl. B-1.2, S.13)
SDS	Natriumlaurylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
λ_{Em}	Wellenlänge des emittierten Lichtes
λ_{Ex}	Wellenlänge des anregenden Lichtes

A EINLEITUNG:

Das Immunsystem hat im höheren Organismus wesentliche Aufgaben bei der Überwindung von Infektionen sowie bei der Überwachung geordneter Zelldifferenzierung zu erfüllen. Dabei kommt einer bestimmten Klasse von Proteinen, den Immunglobulinen, durch ihre Fähigkeit, chemische ("antigene") Strukturen zu erkennen, zentrale Bedeutung zu, indem auf diese Weise körpereigene und körperfremde Substanzen ("Selbst" und "Nicht-Selbst") durch das Immunsystem unterschieden werden können.

Immunglobuline finden sich frei im Serum oder als membrangebundene Rezeptoren an der Oberfläche der Lymphozyten. Die Rezeptoren auf B-Lymphozyten haben dabei die Aufgabe, antigene Strukturen zu erkennen und diese zu binden. Dieses Erkennen durch den Rezeptor wird der Zelle mitgeteilt und setzt, meistens unter Mitwirkung von T-Zellen, einen Prozeß der Proliferation und Differenzierung in Gang, aus dem - in der Regel - in großer Zahl reife Plasmazellen hervorgehen. In diesen werden Immunglobuline mit Spezifität für die auslösende, antigene Determinante synthetisiert und ins Serum sezerniert.

Diese "Antikörper", die sich sowohl in der Blutbahn als auch im extra-vaskulären Raum finden, sind in der Lage, "ihr" Antigen zu erkennen und spezifisch, über nichtkovalente Wechselwirkungen, zu binden. Diese Komplexbildung kann einerseits bewirken, daß das Komplementsystem im Serum aktiviert und dadurch eine Lyse (Zerstörung) der Zellen, die die antigenen Determinanten tragen (z.B. Bakterien), herbeigeführt wird. Andererseits wird der Antigen-Antikörper-Komplex besonders leicht phagozytiert, was ebenfalls eine Elimination des Antigens bewirkt.

Alle Immunglobuline sind in ihrem molekularen Aufbau sehr ähnlich. Sie bestehen, wie schematisch in Abb. 1 gezeigt ist, aus zweierlei Polypeptidketten, den schweren H-Ketten (MW* ca. 50 000 bis

*) MW: Molekulargewicht, Verzeichnis der Abkürzungen s. S.VI

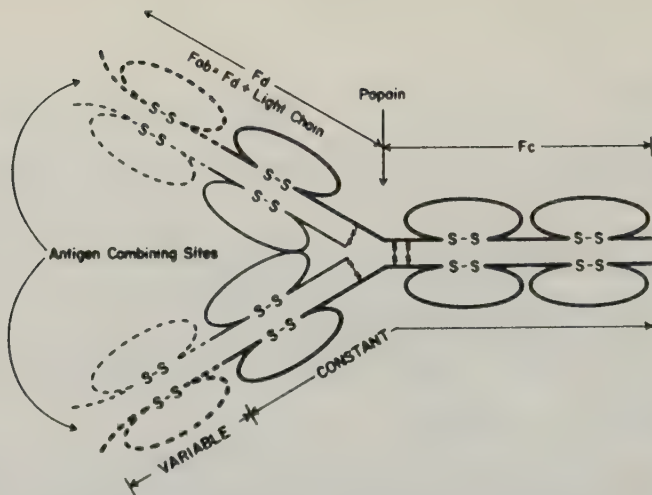


Abb. 1: Schematisches Modell eines Immunglobulin-Moleküls (aus Putnam, 1977)

70 000, je nach Klasse) und den leichten L-Ketten (MW ca. 23 000), die miteinander über Disulfid-Brücken verbunden sind (vgl. Putnam, 1977). Durch Einwirkung von Papain werden drei typische Spaltstücke, nämlich zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Stück (s. Abb. 1) erhalten, wobei der Bereich, in dem das Enzym angreift, als die "hinge-region" bezeichnet wird. Jede Kette besitzt an ihrem N-terminalen Ende einen variablen Teil von etwa 110 Aminosäuren. Der restliche Teil der H-Ketten ist innerhalb der einzelnen Immunglobulinklassen in seinem Aminosäurenaufbau weitgehend konstant. Spezifische (antigene) Unterschiede in diesem konstanten C-terminalen Teil der H-Ketten charakterisieren die für die Säugetiere gefundenen fünf Immunglobulinklassen: Je nachdem, ob in dem Molekül eine γ -, α -, μ -, δ -, oder ϵ -Kette vorgefunden wird, ist es der Klasse IgG, IgA, IgM, IgD oder IgE zuzuordnen. Unter diesen erscheinen die Immunglobuline der Klasse M aus verschiedenen Gründen besonders interessant:

- a) Die μ -Kette, durch die das IgM-Molekül charakterisiert ist, ist diejenige schwere Kette, die sich im Laufe der Evolution zuerst ausgebildet hat. Bereits bei den niedrigsten Vertebraten, den Fischen, finden sich Immunglobuline der M-Klasse (Du Pasquier,

1976). Bei den Amphibien treten zusätzlich Antikörper der IgG-Klasse auf und erst bei den Säugetieren sind alle fünf Immunglobulinklassen vertreten.

- b) Nach B-Zell-Stimulierung wird von den reifen Plasmazellen zuerst IgM synthetisiert. Dieses Immunglobulin ist weniger spezifisch an die auslösende Determinante angepaßt als das später sekretierte IgG, was sich in einer geringeren Affinität der Bindungsstelle bemerkbar macht. Diese geringere Affinität wird jedoch durch die höhere Avidität (oder "functional affinity", Karush, 1976), die von den im IgM-Molekül vorhandenen zehn Bindungsstellen (Dekavalenz) herrührt, weitgehend kompensiert. Hierdurch wird das IgM sehr wirkungsvoll und steht in der Immunantwort in der "first line of defence".
- c) IgM aktiviert nach Antigenbindung wesentlich wirksamer das Komplementsystem als beispielsweise IgG. Auch unterscheidet sich IgM von den anderen Immunglobulinen, indem es bereits nach Binden von monovalentem Antigen in der Lage ist, Komplement zu fixieren (Brown und Koshland, 1975).
- d) Membrangebundene Rezeptoren, die nach Binden von Antigen B-Lymphozyten zur Differenzierung und Proliferation zu Antikörperbildenden Zellen stimulieren, sind der IgM-Klasse zuzuordnen. (Marchalonis, 1976; Vitetta und Uhr, 1975).

Der strukturelle Aufbau von IgM ist von mehreren Arbeitsgruppen intensiv untersucht worden (Putnam et al., 1973; Watanabe et al., 1973; Milstein et al., 1975; Beale und Feinstein, 1970), so daß ein recht genaues Bild dieses Immunglobulin-Typs vorliegt (Abb. 2).

Der intakte Antikörper besteht aus fünf identischen Untereinheiten, die ihrerseits, dem allgemeinen Bauprinzip von Immunglobulinen gehorchend (vgl. Abb. 1), aus je zwei H- und L-Ketten zusammengesetzt und untereinander durch Disulfid-Brücken verbunden sind. Diese Untereinheiten sind, wiederum durch Disulfid-Brücken, und zwar im konstanten C-terminalen Teil der schweren Ketten, zu der Ringstruktur des Pentameren verknüpft. Das schematische Bild, wie es in Abb. 2 gezeigt ist, wurde durch elektronenoptische Aufnahmen bestätigt (Parkhouse et al., 1970; Feinstein et al., 1971).

Während das IgM-Molekül aufgrund seiner Größe (MW ca. 900 000) in seiner Beweglichkeit ziemlich eingeschränkt ist, besitzen die fünf Y-förmigen Arme des Pentameren (vgl. Abb. 2) eine deutlich erhöhte

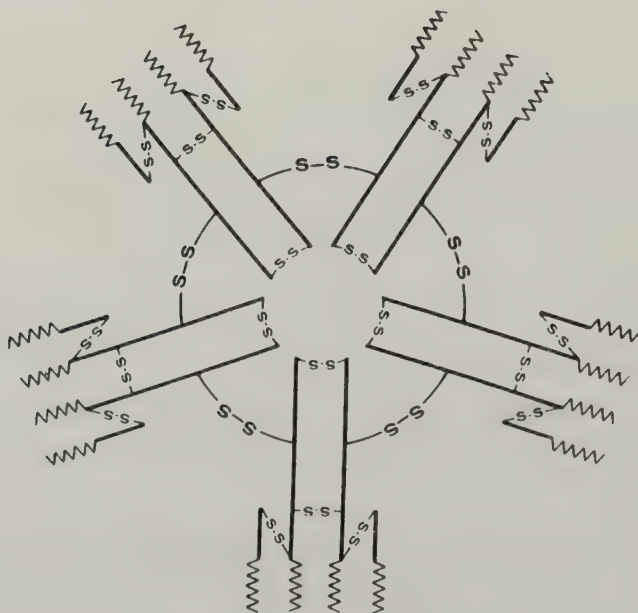


Abb. 2: Schematisches Modell eines IgM-Moleküls (aus Putnam, 1977)

Beweglichkeit ("segmental flexibility") (Zagjansky et al., 1972; Holowka und Cathou, 1976), was für die Reaktion mit Antigenen von Bedeutung sein kann. Die überwiegende Tertiärstruktur der Immunglobulinketten ist die Faltblatt-Struktur, die sich im CD-Spektrum durch eine ausgeprägte negative Elliptizität mit einem Minimum bei ca. 215 nm bemerkbar macht (Ashman et al., 1971).

Zusätzlich zu den H-Ketten (MW = 70 000) und L-Ketten (MW = 23 000) konnte im IgM-Pentameren eine weitere Polypeptidkette, die sogenannte J-Kette (MW = 15 000) nachgewiesen werden. Die Funktion dieser Kette ist bis heute noch nicht genau geklärt. Möglicherweise spielt sie jedoch eine entscheidende Rolle bei der Pentamerisierung der Untereinheiten (Chapuis und Koshland, 1974).

In den IgM-produzierenden Plasmazellen werden ausschließlich diese Untereinheiten gebildet. Erst beim Sekretieren lagern sie sich zu den Pentameren zusammen (Melchers und Andersson, 1973).

Die membrangebundenen Rezeptoren der IgM-Klasse entsprechen den monomeren Untereinheiten und sind über das C-terminale Ende in der Zellmembran verankert. Hierdurch gewinnen die N-terminalen, variablen Regionen, in denen sich die Antigen-Bindungsstellen befinden, eine freiere Beweglichkeit, da sie weit von der starren Zelle entfernt sind.

Während die Antigen-Bindungsstelle durch hypervariable Strukturen von H- und L-Ketten in deren variabler, N-terminaler Region gebildet wird, liegen die "Effektor-sites" (z.B. für Komplement-Aktivierung oder B-Zell-Stimulierung) im konstanten Teil der H-Ketten, in deutlichem Abstand zu den Antigen-Bindungsstellen. Der Übertragungsmechanismus für das auslösende Signal steht bis heute noch immer nicht fest. Als mögliche Erklärungen wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen (Metzger, 1974; Koshland et al., 1966; Huber et al., 1976), von denen hier das "allosterische" näher zu betrachten ist.

Das allosterische Modell, ursprünglich an Beispielen der Enzymchemie entwickelt (Monod, 1965), ist dadurch gekennzeichnet, daß die Effektorwirkung durch eine Konformationsänderung im Protein zustande kommt. Es wird angenommen, daß unabhängig von der Bindung von Ligand ein konformatives Gleichgewicht besteht. Wird an einer "site" Ligand gebunden, so verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten derjenigen Konformation, in welcher der Ligand besser gebunden wird.

Besteht ein solches Gleichgewicht zwischen zwei Konformeren eines Immunglobulins per se, und ist es mit einer Übergangsenthalpie behaftet, so kann gefordert werden, daß sich dieses Gleichgewicht auch aufgrund von Änderungen äußerer physikalischer Parameter, z.B. Temperatur, verschieben läßt. Eine solche Gleichgewichtsverschiebung müßte sich mit empfindlichen physikalisch-chemischen Methoden, z.B. mit optischen oder mikrokalorimetrischen, nachweisen lassen.

Evidenz für das Vorliegen allosterischen Verhaltens von Immunglobulinen konnte von Lancet und Pecht (1976) für das Myelom-IgA MOPC 460 erbracht werden. Die Autoren wiesen durch Aufklärung des Mechanismus der Hapten-Antikörper-Reaktion von MOPC 460 mit DNP-Lysin unter Anwendung des Temperatursprung-Verfahrens (Eigen und De Maeyer, 1963) eine Hapten-induzierte Konformationsänderung des Immunglobulins sowie das Vorliegen dieses Proteins in zwei - ineinander überführbare - konformativen Zuständen nach.

Hinweise auf Konformationsänderungen an IgM wurden zuerst von Haustein (1971, Haustein et al., 1977), später dann ebenfalls von Brown und Koshland (1975) und Pecht (1976) erhalten.

Brown und Koshland untersuchten die Komplement-Aktivierung von anti-Lac-dye-IgM. Sie konnten zeigen, daß Binden von mono-Lac-RNase, einem monovalenten Liganden mit hohem Molekulargewicht, bereits Komplementfixierung durch das IgM-Molekül zur Folge hatte. Ebenfalls mit einem monovalenten, hochmolekularen Liganden (Lysozym-"Loop") fand Pecht bei Anti-"Loop"-Antikörpern Änderungen in der Zirkularpolarisation der Fluoreszenz (CPL), die von Tryptophangruppen im Fc-Teil des IgM-Moleküls stammten. Korrelieren ließen sich diese spektroskopischen Befunde mit denen der Komplementfixierung: auch mono-"Loop", an IgM gebunden, aktiviert das Komplementsystem. Haustein untersuchte die Bindung eines niedermolekularen Liganden, des solvatochromen Pyridiniumabkömmlings ATHP, an eine 19S-Immunglobulin-Fraktion aus Rinderkolostrum. Er fand mittels der Temperatursprung-Methode neben einer Haptenkonzentration-abhängigen schnellen Relaxationszeit, die dem Assoziationsschritt zuzuschreiben ist, eine zweite, weitaus langsamere, die konzentrations-unabhängig war und einer monomolekularen Reaktion zugehörte. Diese monomolekulare Reaktion wurde als konformationelle Änderung des Immunglobulins interpretiert.

Alle diese Untersuchungen an IgM wurden mit induzierten, nicht-homogenen Immunglobulinen durchgeführt. Bei den Studien von Haustein lag nur eine 19S-Fraktion vor, die hauptsächlich IgM, daneben aber auch 19S-IgGs enthielt. Von daher erschien es wünschenswert, Untersuchungen zum Nachweis konformationeller Änderungen mit einem homogenen IgM durchführen zu können.

Unter der großen Anzahl an homogenen Antikörpern und Myelom-Proteinen, die in der letzten Zeit bekannt und intensiv untersucht wurden, existieren nur wenige Beispiele aus der IgM-Klasse, bei denen eine Spezifität für Antigen oder Hapten bekannt ist (Metzger, 1964).

Potter, 1971; Riesen et al., 1975; Tolleshaug und Hannestad, 1975).

Interessant erscheint in dieser Immunglobulinklasse insbesondere das Maus-IgM, das von dem Plasmacytom MOPC 104E gebildet wird und von McIntire et al. (1965) beschrieben und charakterisiert wurde. Ausführliche Analysen der Bindungseigenschaften wurden an diesem IgM von Leon et al. (1970) und Young et al. (1971) durchgeführt. Diese Autoren untersuchten die Bindung von verschiedenen Poly- und Oligosacchariden an dieses Myelomprotein vor allem mit indirekten Meßmethoden, wie z.B. Präzipitation und deren Hemmung, passive Hämagglutination sowie Mikro-Komplementfixierung. Ihre Ergebnisse führten zu dem Schluß, daß MOPC 104E IgM Spezifität für Kohlenhydrate besitzt, die α -(1-3)-Bindungen enthalten. Für diese Spezifität sprechen ebenfalls die Befunde von Carson und Weigert (1973), bei denen die Reaktion von MOPC 104E IgM mit seinen Anti-Idiotyp-Antikörpern durch Serum von BALB/c Mäusen, die mit einem Polyglucan mit hohem Anteil an α -(1-3)-Bindungen immunisiert waren, gehemmt wurde.

Interessant in diesem Zusammenhang sind die neulich veröffentlichten Ergebnisse von Mayers et al. (1978), die zeigen, daß das in BALB/c Mäusen nach Immunisieren mit Dextran-Fraktion S von Leuconostoc mesenteroides NRRL 1355 (Jeanes et al., 1954) bei der Primärantwort gebildete induzierte IgM als homogen betrachtet werden kann und mit dem Myelomprotein MOPC 104E IgM identische Eigenschaften aufweist. Alle diese Befunde sprechen dafür, daß Dextran B1355S das "true antigen" für MOPC 104 IgM darstellt.

Dieses Protein bietet somit außerordentlich günstige Voraussetzungen für Bindungsstudien an einem homogenen IgM, da seine antigene Spezifität genau bekannt ist, und es zudem in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung steht.

Oligosaccharide, die sich aus Poly-[α -D-Glcp-(1-3)- α -D-Glcp-(1-4)] (Nigeran) oder Poly-[α -D-glcp-(1-3)] darstellen lassen (Reese und Mandels, 1964; Johnston, 1965), sind gute Inhibitoren für Antigen-Antikörper-Reaktionen von MOPC 104E IgM und wurden als Haptene für Bindungsstudien an diesem Protein verwendet (Leon et al., 1970; Young et al., 1971).

Oligosaccharide eignen sich insbesondere für Bindungsstudien an Antikörpern, da sie, monovalent, in unterschiedlicher Kettenlänge (Molekülgröße) vorliegen. Klassische Untersuchungen wurden z.B. von Edberg et al. (1972) durchgeführt, der zeigen konnte, daß die scheinbare Valenz von IgM-Antikörpern von der Kettenlänge der Oligosaccharid-Haptene abhängt: Für kurze Haptene fand er die Valenz 10, für Oligosaccharide und Polysaccharide mit MW von 7100 - 237 000 die Valenz 5 und für noch größere Dextran-Moleküle noch niedrigere Valenzen (bis 2,3 bei MW 1 870 000).

In einer ausführlichen Studie von Cisar et al. (1975) wurden an Hand von Bindungsstudien mit Oligosacchariden und unterschiedlich strukturiertem Dextran an zwei unterschiedlichen IgA-Myelomproteinen zwei grundsätzlich unterschiedliche Arten von Bindungsstellen aufgezeigt: Das Myelomprotein W3129 hat maximale Affinität für das Pentasaccharid IM5, aber Methyl- α -D-Glucopyranose liefert 55 % der maximalen Bindungsenergie. Mit einem chemisch synthetisierten, strikt linear aufgebauten Poly-[(α -D-Glcp-(1-6)] Ruckel und Schuerch, 1966) präzipitiert dieses Immunglobulin nicht. Seine Bindungsstelle läßt sich als Höhle betrachten. Auf der anderen Seite bindet das Myelomprotein QUPC 52, das ebenfalls Spezifität für Oligosaccharide der Isomaltosereihe aufweist und maximale Affinität für das Hexasaccharid IM6 besitzt das Mono- oder Disaccharid kaum (mit nur etwa 5 % der maximalen Bindungsenergie). Mit dem strikt linear aufgebauten Dextran jedoch ist dieses Immunglobulin in der Lage, zu präzipitieren. In diesem Falle ist die Bindungsstelle nicht ausschließlich gegen das terminale Ende der Oligo- oder Polysaccharide gerichtet wie bei Protein W3129, sondern gegen α -(1-6)-verknüpfte Glucoseeinheiten, die in terminaler Position oder inmitten der Polysaccharidkette zu finden sind. Seine Bindungsstelle ist somit eher als eine Art Graben zu betrachten, in dem die Wechselwirkungen mit dem Immunglobulin stattfinden.

Ein genaueres Bild über die Bindungsstelle von Immunglobulinen ist in der letzten Zeit durch direkte kristallographische Untersuchungen mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie gewonnen worden (Amzel et al.,

1974; Segal et al., 1974; Poljak et al., 1976; Davies und Padlan, 1977). Mit anderen physikalisch-chemischen Methoden, z.B. thermodynamischen (Kabat, 1976; Karush, 1962; Schechter, 1972; Cisar et al., 1975), kinetischen (Pecht et al., 1972; Haselkorn et al., 1974) sowie spektroskopischen Methoden (Hsia und Piette, 1969; Schlessinger et al., 1974) wurden ebenfalls Untersuchungen zum besseren Verständnis der Hapten-Bindung und der Topologie der Bindungsstelle vorgenommen. Jedoch gehört unter all diesen untersuchten Immunglobulinen keines der IgM-Klasse an, die aufgrund ihrer biologischen Bedeutung von besonderem Interesse ist.

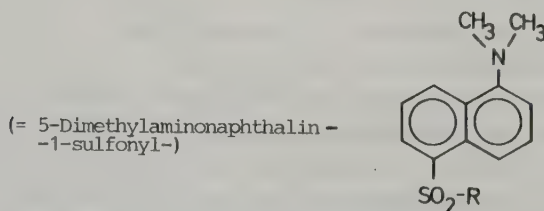
Unter diesen Aspekten entstand der Plan, in der vorliegenden Arbeit - im Anschluß an die zuvor von Haustein in derselben Arbeitsgruppe durchgeführten kinetischen Untersuchungen (s. o.) - thermodynamische und kinetische Bindungsstudien an MOPC 104E IgM mit Oligosaccharid-Haptenen vorzunehmen.

Es konnte davon ausgegangen werden, daß Oligosaccharide in unmodifizierter Form sich nur in beschränktem Ausmaß für Bindungsstudien - meist nur für indirekte Messungen (als Inhibitoren z.B.) - verwenden lassen. Für direkte Bindungsexperimente mit nicht-markierten Oligosacchariden sind nur wenige Beispiele in der Literatur bekannt. Hierunter sind besonders die Studien an XRPC 24 und J539 (beides Myelom-IgA-Proteine) zu erwähnen, bei denen die Thermodynamik der Hapten-Antikörper-Bindung durch fluorimetrische Titration mit dem unmodifizierten Oligosaccharid untersucht wurde (Jolley et al., 1973, 1974; Jolley und Glaudemans, 1974), und erst neulich reaktionskinetische Studien mit Hilfe des Fluoreszenz-Temperatursprung-Verfahrens durchgeführt wurden (Vuk-Pavlović et al., 1978).

In der Regel ist für Bindungsstudien mit Oligosacchariden jedoch das Anbringen eines Markers (Reportergruppe) notwendig, durch den angezeigt wird, welche Anteile des Kohlenhydrats gebunden und frei vorliegen. Hierzu werden oftmals Oligosaccharide radioaktiv markiert, entweder mit ^3H (Katz und Pappenheimer, 1969; Barnett, 1972;

Young et al., 1971) oder durch Radiojodierung mit ^{125}J (Himmels-
pach et al., 1977). Als Reportergruppe, die zu einem hohen Fluores-
zenzquench beim Immunglobulin führte, benutzten Harisdangkul
und Kabat (1972) 1-(Nitrophenyl)-flavazol-Derivate (Himmels-
pach et al., 1971; Kleinhammer et al., 1973) von Oligosacchariden
der Isomaltose-Reihe. Unter Ausnutzung des starken Quenches der
Proteinfluoreszenz führte Lancet (Pecht und Lancet, 1977) reaktions-
kinetische Untersuchungen mit Flavazolderivaten von Oligosacchari-
den der Isomaltose-Reihe an anti-Dextran-Antikörpern durch.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit geplanten Studien an MOPC 104E IgM
konnte die Flavazol-Methode zur Markierung der Oligosaccharid-
Haptene nicht angewendet werden, da zur Flavazolbildung das redu-
zierende Ende sowie die Hydroxylgruppen an den Kohlenstoffatomen
2 und 3 nicht substituiert sein dürfen. Andererseits betrug der
maximale Quench der Proteinfluoreszenz nach Sättigung des IgM mit
den Haptenen der α -(1-3)-Glucan-Reihe nur ca. 10 % (Blatt, 1976).
Aus diesem Grund war es für die vorgesehenen thermodynamischen und
kinetischen Bindungsstudien wünschenswert, durch Markieren der
Oligosaccharid-Haptene mit einer geeigneten Reportergruppe die
Fluoreszenzeffekte zu verstärken, um eine genauere Auswertung zu
ermöglichen. Als Alternativ-Methode zur Herstellung der Flavazole
bot sich das Markieren der Oligosaccharide an ihrem reduzierenden
Ende mit der Dansyl-



gruppe an, einem sehr starken Fluorophor, der sowohl direkt (bei
induzierten Anti-Dansyl-Antikörpern) als auch als Reportergruppe

(Parker et al., 1967; Yguerabide et al., 1970; Pecht et al., 1971; Tumerman et al., 1972; Schlessinger et al., 1974; Pecht, 1975; Holowka und Cathou, 1976) bei Bindungsstudien Verwendung fand. Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften erschien es außerdem möglich, die Dansylgruppe als sensitiven Marker zu verwenden, um aus den beobachteten Fluoreszenzänderungen Aufschluß über die direkte Nachbarschaft des Fluorophors zu erhalten. Auf die speziellen Vorzüge der Dansylgruppe als Fluoreszenz-Marker von Haptenen für Bindungsstudien an Immunglobulinen ist in Teil C-1.4, S.68 dieser Arbeit ausführlicher eingegangen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es möglich, unter Anwendung verschiedener Haptenderivate, insbesondere dansylierter Oligosaccharide, genauere Kenntnisse über die Bindungseigenschaften von MOPC 104E IgM zu erhalten. Ein Großteil der physikalisch-chemischen Messungen wurde während Gastaufenthalten am Weizmann-Institute of Science, Rehovot/Israel (Arbeitsgruppe I. Pecht) sowie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen (Arbeitsgruppe Th. Funck) durchgeführt.

Durch Vergleich der bis heute bekannten thermodynamischen Bindungsparameter sowie mit Hilfe spektroskopischer Methoden konnte ein verfeinertes Bild der Hapten-Bindungsstelle skizziert werden. Reaktionskinetische Untersuchungen erbrachten die Aufklärung eines Mechanismus für die Hapten-Bindungs-Reaktion, der mit dem allosterischen Modell in Einklang steht. Experimente zum Studium der Temperaturabhängigkeit von MOPC 104E IgM (in Abwesenheit von Hapten) erbrachten Hinweise auf zusätzliche Zustandsformen des Proteins.

B EXPERIMENTELLER TEIL

B-1 Materialien:

B-1.1 Bezugsquellen:

Die Herkunft aller Materialien, soweit es sich nicht um handelsübliche Chemikalien handelt oder soweit sie nicht unten speziell aufgeführt sind, werden an den entsprechenden Stellen in dieser Arbeit zitiert. Bei den verwendeten Chemikalien handelte es sich in der Regel um Reagenzien von analytischem Reinheitsgrad. Für fluorimetrische Untersuchungen wurde zur Herstellung aller Lösungen ausschließlich bidestilliertes Wasser bzw. Uvasol-Lösungsmittel (Merck, Darmstadt) verwendet.

Dankbar bin ich für die freundliche Überlassung von:

Dextran-Fraktion S von Leuconostoc mesenteroides NRRL B1355

(Dr. A. Jeanes, Northern Regional Research Laboratory,
Peoria, Illinois)

Plasmacytom MOPC 104E-tragenden Mäusen (Dr. M. Potter, National
Cancer Institute, Bethesda, Maryland)

BALB/c Mäuse des NIH, die bei uns in Zucht genommen wurden
(Dr. R. DiPauli, Universität Konstanz)

Hammel-anti-Maus-Serumprotein-Antiserum (Dr. E. Rüde, Universität
Mainz)

Ziegen-anti- μ -Ketten-Antiserum (Dr. J. Haimovich und Y. Bergman,
Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel)

N4A-CHO (Y. Blatt, Weizmann Institute of Science, Rehovot,
Israel).

B-1.2 Puffer und Lösungen:

BSB: Boratgepufferte Kochsalzlösung, Farr-Puffer (Minden und Farr, 1973):

6,18 g Borsäure,
9,54 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ und
4,38 g NaCl werden in einem Meßkolben mit H_2O auf
1000 ml aufgefüllt. Der pH beträgt 8,4 - 8,5.

Gly/HCl: 0,1 m Glycin-HCl-gepufferte Kochsalzlösung nach
Sørensen, pH 2,8 (Diem und Lentner, 1975):

5,67 g Glycin und
4,42 g NaCl werden in
756 ml H_2O gelöst und mit
244 ml 0,1 m HCl versetzt.

PSB: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 0,02 m an PO_4^{3-} , pH 7,2:

900 g NaCl
7,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ werden in 900 ml H_2O gelöst, mit
HCl auf pH 7,2 eingestellt und mit H_2O auf
1000 ml aufgefüllt.

Dulbecco's PBS: (Dresser und Greaves, 1973):

Lösung 1: 40,45 g NaCl,
1,45 g KCl,
1,45 g KH_2PO_4 und
14,60 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ werden in H_2O gelöst
und auf
400 ml aufgefüllt.

Lösung 2: 1,26 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden in
50 ml H_2O gelöst.

Lösung 3: 0,95 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ werden in
50 ml H_2O gelöst.

80 ml von Lösung 1 werden mit
400 ml H_2O und
10 ml von Lösung 3 gemischt. Hierzu wird langsam unter
Rühren eine Mischung aus
500 ml H_2O und
10 ml von Lösung 2 hinzugegeben. Der pH beträgt 7,2.

Bray'sche Lösung: Szintillationsflüssigkeit nach Bray (1960):

60,0 g Naphthalin,
4,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol),
200 mg POPOP (1,4-Bis[2-(5-phenyl)-oxazolyl]benzol),
20 ml Äthylenglycol und
100 ml Methanol werden mit p-Dioxan auf
1000 ml aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird in einer dunklen
Flasche aufbewahrt.

Speziell verwendete Lösungen und Puffer sind an den entsprechenden Stellen im Text beschrieben.

B-2 Gewinnung, Charakterisierung und Derivatisierung von
Oligosaccharid-Haptenen:

B-2.1 Reinigung, Nachweis und Analyse:

B-2.1.1 Papierchromatographie (Partridge, 1948):

Methode: absteigende Chromatographie
Papier: Whatman 3MM (46 x 57 cm)
Laufmittel: n-Butanol/Pyridin/Wasser 6:4:3 (v/v/v)

B-2.1.2 Papierelektrophorese (Kickhöfen und Warth, 1968):

qualitativ: Papier: SELECTA Nr. 2043a (15 x 70 cm)
(Schleicher & Schüll)
Spannung: 3000 V (d.h. 45 V/cm)
präparativ: Papier: Whatman 3MM (46 x 57 cm)
Spannung: 900 V (d.h. 15 V/cm)
Elektrolytpuffer: Pyridin/Essigsäure/Wasser 100:40:860 (v/v/v)

B-2.1.3 Dünnschichtchromatographie (Stahl, 1967)

Material: DC-Plastikfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)
DC-Plastikfolien Cellulose F₂₅₄ (Merck)

Laufmittel: A) Methyläthylketon/Benzol 1:3 (v/v)
B) n-Butanol/Pyridin/Wasser 6:4:3 (v/v/v)

B-2.1.4 Färbemethoden auf Dünnschichtplatten und Papier

Reagenz auf Kohlenhydrate (Osborn, 1963):

Reagenzlösungen:

- (A) NaJO₄-Lösung: 430 mg NaJO₄ werden in
50 ml Wasser gelöst.
Die Lösung wird bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.
Vor Gebrauch wird die benötigte Menge 1:1 mit
Aceton verdünnt.
- (B) AgNO₃-Lösung: 400 ml Aceton werden unter Rühren mit
2 ml einer kalt gesättigten AgNO₃-Lösung
versetzt. Der sich dabei bildende Niederschlag
wird durch Zugabe weniger Tropfen Wasser ge-
löst.
- (C) NaOH-Lösung: 4 g NaOH werden in 5 ml Wasser gelöst und mit
500 ml Methanol versetzt.
- (D) Na₂S₂O₃-Lösung: 25 g Na₂S₂O₃ werden in 500 ml Wasser gelöst.

Nachweis:

Nach Trocknen wird mit (A) besprüht und nach erneutem Trocknen
sukzessiv in (B) und (C) getaucht. Reduzierende sowie mit
Perjodat spaltbare Kohlenhydrate geben eine braun-schwarze Fär-
bung. Das Fixieren der Anfärbung erfolgt durch Eintauchen in
(D). Danach wird gut mit Wasser gespült und getrocknet.

Reagenz auf primäre Amine (Stahl, 1967):

Reagenzlösung:

1,25 g Ninhydrin werden in 500 ml Aceton gelöst.

Nachweis:

Nach Eintauchen in die Reagenzlösung werden die Chromatogramme bzw. Elektropherogramme auf 110°C erhitzt. Primäre Amine geben eine rot-violette Färbung.

Reagenz auf Phenole (Pauly's Reagenz) (Kleinhammer, 1972):

Reagenzlösung:

50 mg diazotierte Sulfanilsäure werden unmittelbar vor Gebrauch in 25 ml 20 %iger Sodalösung gelöst.

Nachweis:

Nach Besprühen mit der Reagenzlösung geben Phenole eine orangefarbene Färbung.

B-2.1.5 Gelchromatographie:

Säulen: Sephadex G15, Gelbett 1,8 cm² x 48 cm
Sephadex G25, Gelbett 5,7 cm² x 35 cm
Biogel P2, Gelbett 3,14 cm² x 120 cm

Elutionsmittel: Wasser

Wasser, 1 %ig an n-Butanol

Elutionsgeschwindigkeit: ca 20 ml/h

Detektionssysteme: a) Transmission bei 254 nm mit Uvicord
(LKB, Stockholm)

b) Brechungsindexänderung mit Differential-
Refraktometer Lamidur (Winopal, Hannover)

B-2.1.6 Analytische Nachweismethoden:

Anthron-Test auf reduzierende Monosaccharideinheiten

(Kabat, 1961):

Reagenz: 200 mg Anthron werden in 100 ml konz. H₂SO₄ gelöst.

Durchführung:

Zu je 1 ml der Probenlösungen, die etwa 10 - 100 µg Kohlehydrat enthielten, wurden unter Eiskühlung je 2 ml Reagenz hinzugegeben. Die Proben wurden gut gemischt (Whirlmix)

und genau 10 Minuten lang auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach erneutem Mischen wurden die Proben sofort in Eiswasser gestellt. Die Anwesenheit reduzierender Monosaccharideinheiten färbt sich die Lösung blau.

Für quantitative Bestimmungen von Oligo- und Polyglucanen wurde die Extinktion bei 620 nm (gegen Wasser) mit einem Zeiss PMQ II Spektralphotometer gemessen. Die nach Hydrolyse vorliegende Glucosekonzentration wurde einer gleichzeitig ermittelten Eichkurve (α -Methylglucopyranose, 10 - 120 $\mu\text{g/ml}$) entnommen. Die molare Konzentration c der Probelösung berechnet sich nach

$$c \text{ [mol/l]} = \frac{\mu\text{g nachgewiesene Glucose}}{1,8 \cdot 10^5 \cdot a \cdot \text{ml Probevolumen}}$$

wobei a die Anzahl der aus einem Molekül des Oligomeren nach Hydrolyse entstandenen reduzierenden Glucoseeinheiten bedeutet. Glucoseeinheiten, die nach Hydrolyse keine reduzierenden Gruppen enthalten (z. B. Alditole), färben nicht mit dem Anthron-Reagenz (Peat et al., 1956).

Fluram-Test auf primäre Amine (Böhlen et al., 1973; Udenfriend et al., 1972 und Weigele et al., 1972):

Reagenzlösungen:

- (A) Fluram-Lösung: 5 mg Fluram (Hoffmann-La Roche, Grenzach) werden in 1 ml DMF gelöst und in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.
- (B) Phosphat-Puffer: 10,744 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ werden in 90 ml H_2O gelöst, mit H_3PO_4 auf pH 9,0 eingestellt und mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Durchführung:

100 μl der Probelösung wurden mit 2 ml (B) versetzt, auf dem Whirlmix intensiv gemischt und während des Mischens mit 200 μl (A) versetzt. Nach 5 Minuten wurde die Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Ex}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 480 \text{ nm}$) in einem Zeiss PMQ II Spektralphotometer mit Fluoreszenzansatz ZFM4 gemessen.

Fluram reagiert mit primären Aminen unter Ausbildung einer intensiv fluoreszierenden Verbindung, während das Reagenz selbst sowie dessen Hydrolyseprodukt nicht fluoresziert.

Willstätter-Schudel-Bestimmung von reduzierenden Gruppen

(Willstätter und Schudel, 1918):

Reagenzlösungen:

- (A) Phosphat-Puffer: 60 ml 0,1 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung und 30 ml 0,1 n Natronlauge werden mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt.
- (B) 0,1 n Jod-Lösung (Titrisol, Merck, Darmstadt)
- (C) 0,2 n Schwefelsäure
- (D) 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (Titrisol, Merck, Darmstadt)

Durchführung:

Die neutralen Probelösungen (ca. 1 - 2 ml) wurden in einen 100 ml Schliff-Erlenmeyerkolben gegeben, 5 ml (A) hinzugefügt und mit 1000 μl (B) versetzt. Der Kolben wurde mit einem Stopfen, dessen Schliff mit einigen Tropfen KJ-Lösung beträufelt wurde, verschlossen. Nach einstündigem Stehen bei Raumtemperatur wurden 5 ml (C) hinzugefügt und das nicht verbrauchte Jod mit (D) zurücktitriert (Stärke-Indikator).

Der Verbrauch von 1 ml 0,1 n Jod-Lösung entspricht der Oxidation von 0,05 mmol Aldose zur entsprechenden Aldonsäure.

B-2.1.7 Optische Analysemethoden:

Polarimetrie:

Die optische Drehung wurde mit einem Perkin-Elmer 141M Polarimeter (Na-Lampe, 589 nm) gemessen. Benutzt wurde eine Küvette von 0,9999 dm Länge und 1 ml Volumen. Die spezifische optische Drehung berechnet sich nach

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{100 \cdot \alpha}{d \cdot c} \quad \left[\frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^3}{\text{dm} \cdot \text{g}} \right]$$

Hierbei bedeuten: α : gemessener Drehwinkel
 d : Schichtdicke in dm (= 0,9999)
 c : Konzentration in g/100 ml
 T : Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
 λ : Wellenlänge des eingestrahlt polarisierten Lichtes (= 589 nm)

Die molekulare optische Drehung berechnet sich aus der spezifischen optischen Drehung nach

$$[M]_{\lambda}^T = [\alpha]_{\lambda}^T \cdot \frac{MW}{100} \left[\frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{Dezimol}} \right]$$

MW bedeutet das Molekulargewicht der untersuchten Substanz.

UV-Spektroskopie:

UV-Absorptionsspektren wurden auf einem Cary 118 Spektralphotometer registriert.

Fluoreszenz-Spektroskopie:

Excitations- und Emissionspektren wurden mit einem Perkin Elmer MPF 4 bzw. MPF 44A Spektrofluorimeter registriert.

Die Temperatur in den Quarz-Küvetten (1 x 1 cm bzw. 0,7 x 0,7 cm, Hellma, Müllheim), die sich in einem thermostatisierbaren Küvettenhalter befanden, wurde auf $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ gehalten.

IR-Spektroskopie:

Infrarotspektren wurden mit einem Perkin-Elmer Infracord M 137 registriert.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden als KBr-Pressling (ca. 2 mg Substanz/250 mg KBr) in den Strahlengang gebracht).

B-2.2 Präparative Methoden:

B-2.2.1 Herstellung der Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe:

Züchten von *Aspergillus niger* (Johnston, 1965):

Aspergillus niger IMI 17454 (Commonwealth Mycological Institute, Kew, GB) wurde aus Sporen in Czapek-Dox-Kulturen (Oxoid, London) 11 Tage bei Raumtemperatur auf Agar-Platten und anschließend 24 h bei 30°C in 1 l Flüssigmedium vorgezüchtet. Das weitere Wachsen des Schimmelpilzes erfolgte nach der Vorschrift von Johnston (1965) in einem Fermenter (New Brunswick Fermacell 130) 71 Stunden lang bei 30°C in 75 l des folgenden Mediums:

150,0 g NaNO_3
37,5 g KCl
37,5 g Magnesium-Glycerophosphat
37,5 g FeSO_4
26,0 g K_2SO_4
2,25 kg Saccharose
75 l H_2O

Während der Fermentierung sank der pH von anfangs 6,6 kontinuierlich auf 5,5 ab. Die Ausbeute an nassem Mycelium betrug 8,8 kg (aus einem kleineren, analog durchgeführten Ansatz (14 l Medium) wurden 2,8 kg nasses Mycelium erhalten).

Isolierung der Zellwand-Polysaccharide (analog Johnston, 1965):

Das nasse Mycelium (2,7 kg) wurde in 4 l Wasser suspendiert, 10 Min. bei 117°C autoklaviert und sofort anschließend durch einen Leinensack filtriert. Beim Abkühlen des Filtrates bildete sich ein weißes Präzipitat: Nigeran. Das Mycelium wurde weiterhin so mit Wasser autoklaviert und heiß filtriert, bis die Filtrate beim Abkühlen klar blieben. Die vereinigten Filtrate wurden über Nacht in den Kühlraum gestellt und das ausgefallene Nigeran abzentrifugiert. Um das Nigeran von kleineren Myceliumresten zu befreien wurde es in 300 ml kochendem Wasser gelöst, heiß abfiltriert und das, nach Abkühlen des Filtrates ausgefallene, Nigeran abgenutscht und gut mit kaltem Wasser gewaschen.

Die noch im Mycelium vorhandenen Polysaccharide (neben nicht herausgelöstem Nigeran vor allem das α -(1-3)-Glucan) wurden durch mehrmalige Extraktion mit n Natronlauge herausgelöst. Wie ein Probeversuch gezeigt hatte, waren sieben Extraktionen ausreichend.

Zum Extrahieren wurde das Mycelium mit der Natronlauge versetzt und ausgiebig mittels eines mechanischen Rührers in der Natronlauge zerteilt. Es wurde soviel Lauge zugesetzt, daß sich das Mycelium mühelos abzentrifugieren ließ. Zentrifugiert wurde 20 Min. in einer präparativen Becherzentrifuge mit 6 Bechern zu je 800 ml Inhalt bei 3000 rpm (W. Stock, Marburg). Die Überstände wurden ab-

dekantiert, vereinigt und durch eine Glasfritte (G 3) gesaugt. Sodann wurde das Filtrat unter Rühren mit Eisessig neutralisiert. Dabei flockten die extrahierten Polysaccharide aus. Sie wurden abzentrifugiert, mehrmals mit Wasser gewaschen und unter Rühren in 1,6 l 40 mmolare NaHCO_3 -Lösung suspendiert. Hierzu wurden 40 mg Trypsin und einige Tropfen Chloroform gegeben. Danach wurde 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Polysaccharide abfiltriert, dreimal mit Wasser gewaschen und durch Lösen in n Na-tronlauge und Neutralisieren mit Eisessig am pH-Meter umgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Wasser salzfrei gewaschen. Im wesentlichen bestand er aus α -(1-3)-Glucan, dem geringe Mengen von Nigeran beigemischt waren.

Da Nigeran, im Gegensatz zu α -(1-3)-Glucan, in heißem Wasser (oberhalb 85°C) gut löslich ist, konnte es durch Heißwasserextraktion aus dem Niederschlag nahezu quantitativ entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde der Niederschlag mehrmals mit 4 l H_2O bei 117°C autoklaviert und kochend heiß abgenutscht. Die Filtrate wurden in Saugflaschen, die von außen mit Eis gekühlt wurden, aufgefangen. Diese Extraktion wurde so oft wiederholt, bis die beiden letzten Filtrate klar blieben. Nun konnte davon ausgegangen werden, daß das α -(1-3)-Glucan, das sich im Filtrierrückstand befand, kein Nigeran mehr enthielt.

Aus den kaltgestellten Filtraten wurde das ausgefallene Nigeran abzentrifugiert, in Wasser resuspendiert, lyophilisiert und mit dem mittels direkter Heißwasserextraktion aus dem Mycelium isolierten Nigeran vereinigt.

Das in heißem Wasser unlösliche α -(1-3)-Glucan wurde in 700 ml Methanol suspendiert und 4 h am Rückfluß gekocht. Nach Absaugen auf einer G1-Fritte wurde das Polysaccharid mit Methanol und Di-äthyläther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute aus 2,7 kg nassem Mycelium:

Nigeran	4,94 g	(Johnston: 3,7 g
---------	--------	------------------

α -(1-3)-Glucan:	11,73 g	13,0 g)
-------------------------	---------	---------

Saure Partialhydrolyse von α -(1-3)-Glucan (analog Johnston, 1965):

a) Probehydrolyse:

Zu 200 mg α -(1-3)-Glucan wurden in einem Rundkolben bei äußerer Erhitzung im siedenden Wasserbad 3 ml 99,5 %ige Ameisensäure und nach 10 minütigem Rühren 33 ml kochende 0,4 n Schwefelsäure gegeben. Nach verschiedenen Hydrolysezeiten (13, 16, 20, 24, 30, 40, 46, 51, 55, 60, 70, 74 und 80 Minuten sowie nach 14 h $\pm$ Totalhydrolyse) wurden Doppelproben von je 1 ml entnommen und sofort mit Natronlauge auf pH 6 - 7 neutralisiert. Der Hydrolysegrad α in den einzelnen Proben wurde durch Willstätter-Schudel-Bestimmung (s. 2.1.7, S.18) ermittelt. Aus dem Verbrauch an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ berechnet sich α nach

$$\alpha = \frac{B - M}{B - T}$$

wobei B, M und T den $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Verbrauch in ml beim Blindwert (Wasser), der Messprobe und dem Totalhydrolysat angibt.

b) Präparative Partialhydrolyse:

In einem 2 l Rundkolben wurden 10 g α -(1-3)-Glucan auf dem Ölbad bei 100°C erhitzt. Hierzu wurden unter Rühren 150 ml 99,5 %ige Ameisensäure und nach weiteren 10 Minuten (das Polysaccharid hatte sich vollständig in der Ameisensäure gelöst) 1,5 l kochende 0,4 n Schwefelsäure hinzugefügt. Genau 17 Minuten nach Zugabe der Schwefelsäure wurde die Hydrolyse durch Eingießen des Ansatzes in eine eisgekühlte NaOH-Lösung (140 g NaOH in 300 ml Wasser) und anschließende Neutralisation mit Natronlauge auf pH 6,8 abgebrochen. Das Partialhydrolysat wurde am Rotationsverdampfer auf etwa 1 l eingengt.

Isolierung der Oligosaccharide mittels Adsorptionschromatographie

(Whistler und Durso, 1950; Johnston, 1965):

a) Präparation einer 3,5 l Kohle-Celite-Säule:

750 g Aktivkohle Darco G60 (Serva, Heidelberg) wurden mit 750 g Celite Typ 545 (Serva, Heidelberg) intensiv gemischt und mit Wasser zu einem dickflüssigen Brei angerührt. Dieser Brei wurde in eine Säule (38 cm² x 110 cm) gefüllt und die Kohle-Celite-Säule mit Wasser gewaschen.

b) Chromatographie des Partialhydrolysats:

Die neutralisierten und vereinigten Hydrolyseansätze (von insgesamt 30 g Polysaccharid ausgehend) wurden auf die Kohle-Celite-Säule gegeben. Mit Wasser wurde so lange gewaschen, bis

im Eluat keine Sulfationen mehr nachweisbar waren (ca. 4 l). Anschließend wurde mit 5 %igem Äthanol eluiert, bis alle Glucose von der Säule heruntergewaschen war (ca. 9 l). Die folgende Desorption der adsorbierten Oligosaccharide erfolgte durch einen linearen Wasser/Äthanol-Gradienten, der innerhalb von 70 l von 5 zu 28,5 Vol-% Äthanol anstieg. Bis zu diesem Alkoholgehalt wurden sukzessiv alle Oligomeren vom Polymerisationsgrad $n = 2$ bis einschließlich $n = 7$ eluiert. Während der gesamten Chromatographie stand die Säule unter einem Überdruck von 0,4 bis 0,7 atm. Es wurden Fraktionen von 300 - 500 ml aufgefangen und mittels Anthron-Test (B-2.1.6) auf Kohlenhydratgehalt untersucht. Die Fraktionen, die die jeweiligen Oligosaccharide enthielten, wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer einrotiert. Der Rückstand, aufgenommen in Wasser, wurde lyophilisiert und im Vakuumtrockenschrank über P_2O_5 bei 40°C getrocknet.

Der Verlauf der Chromatographie ist in Abb. 6 , S. 53 dargestellt.

Reinigung der Oligosaccharide:

Für physikalisch-chemische Messungen sowie Bindungsstudien wurden die Oligosaccharide mittels Papierchromatographie und anschließender Gelchromatographie an Sephadex G15 oder Biogel P2 gereinigt.

Zur Charakterisierung von α -(1-3)-Glucan und der isolierten Oligosaccharide siehe C-1.3 (S.53).

B-2.2.2 Herstellung von Oligosaccharid-Derivaten:

Reduktion zu den Alditolen (Katz und Pappenheimer, 1969; Young et al., 1971):

15 μ mol Oligosaccharid wurden in 1 ml Wasser gelöst und 5 mg $NaBH_4$ hinzugefügt. Nach 6stündigem Stehen wurden zur Vervollständigung der Reaktion nochmals 5 mg $NaBH_4$ hinzugefügt und der Ansatz über Nacht stehengelassen. Das überschüssige, nicht umgesetzte Reagenz wurde durch Zutropfen von 1 n Essigsäure zerstört. Der Ansatz wurde sodann fünfmal mit schwach angesäuertem Methanol am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft (Zerstörung des Kohlenhydrat-Borat-Komplexes). Zum Abtrennen von Salzen wurde der

Ansatz anschließend an Sephadex G15 chromatographiert. Die Alditole enthaltenden Fraktionen wurden mittels des Anthron-Tests (B-2.1.6) ermittelt, vereinigt, lyophilisiert und getrocknet. Die Ausbeuten an Alditolen betrugen ca. 90 %.

Herstellung von ^3H -markierten Alditolen:

Die Reduktion der Oligosaccharide erfolgte in der gleichen Weise wie oben beschrieben, mit der einen Ausnahme, daß an Stelle der zuerst zugesetzten Menge NaBH_4 in diesem Falle 2 mg NaB^3H_4 (661 mCi/mmol, Amersham, GB) zugegeben wurden. Die Aufarbeitung des Ansatzes war ebenfalls die gleiche, wie oben beschrieben. Für die Chromatographie wurde ausschließlich Wasser als Elutionsmittel verwendet. Die Fraktionen wurden mit dem Anthron-Test (B-2.1.6) auf ihren Gehalt an Kohlenhydrat, sowie mittels Szintillationsmessungen in Bray'scher Lösung (B-1.2) in einem Packard Tri-Carb Modell 3255 auf Radioaktivitätsausbeute untersucht. Die Fraktionen, die das markierte Alditol enthielten, wurden vereinigt, ihre Konzentration und spezifische Aktivität bestimmt und eingefroren bei -20°C aufbewahrt. Der Chromatographieverlauf ist in Abb. 12, S.66 gezeigt.

Herstellung von 1-Amino-1-desoxy-alditolen:

a) Über das Oxim mit anschließender katalytischer Hydrierung:

Oximherstellung (Lamchen und Whistler, 1971):

Reagenzlösung: 100 mg $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ und 120 mg Natriumacetat werden in 2,9 ml 50 %igem Äthanol gelöst.

30 μmol Oligosaccharid wurden in 125 μl Wasser gelöst und mit 125 μl Äthanol versetzt. 250 μl der Reagenzlösung wurden hinzugefügt und der Ansatz unter Rühren 15 min bei 75°C erhitzt. Nachdem der Ansatz weiterhin über Nacht bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde er am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedunstet, in wenig Wasser aufgenommen und durch Zusatz von Amberlite MB3 (Serva, Heidelberg) entsalzt. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert, nachgewaschen und das Filtrat mit dem Waschwasser zusammen einrotiert. Das Oxim wurde nicht isoliert, sondern der gesamte Ansatz sofort reduziert.

Katalytische Reduktion des Oxims (Rosemund und Pfankuch, 1923):

Der einrotierte Oxim-Ansatz wurde in 20 ml 50 %iger Essigsäure aufgenommen, mit 100 mg Pd/BaSO_4 (10 % Pd) versetzt und 4 h in einer H_2 -Atmosphäre bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert. Danach wurde der Katalysator über Kristall-

theorit abfiltriert, das Filtrat einrotiert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und das Amin mittels präparativer Papierelektrophorese isoliert.

b) Mittels reduktiver Aminierung:

Reduktive Aminierung mit Dimethylaminoboran (DMAB) (analog Billman und McDowell, 1961):

30 μmol Oligosaccharid wurden in 1 ml einer 0,2 m Ammoniumacetatlösung in 0,1 n Ammoniak gelöst. Hierzu wurden 1 ml Methanol gegeben und ca. 10 mg DMAB hinzugefügt. Der Ansatz wurde drei Tage bei 37°C gerührt und das sich gebildete Amin von unumgesetzten Zucker und Reagenz papierelektrophoretisch abgetrennt und isoliert.

Reduktive Aminierung mit Natrium-Cyanoborhydrid (NaCNBH_3) (Wiegandt und Ziegler, 1974; Himmelsbach et al., 1977):

30 μmol OS wurden mit 92 mg Ammoniumbromid in 700 μl Wasser gelöst und hierzu 1,6 ml Methanol gegeben. Nach Hinzufügen von 8 mg NaCNBH_3 wurde der Ansatz 7 h unter Rückfluß gekocht und das sich gebildete 1-Amino-1-desoxy-alditol mittels präparativer Papierelektrophorese isoliert.

c) Anmerkungen:

Die oben beschriebenen Methoden zur Herstellung der 1-Amino-1-desoxy-Alditole ergaben in Modellversuchen mit Oligosacchariden der Isomaltose-Reihe (IM3 und IM4) Ausbeuten an den entsprechenden Aminen von etwa 30 - 50 %. Mit den OS der α -(1-3)-Glucan-Reihe führte unter den angegebenen Bedingungen nur die reduktive Aminierung mit Natriumcyanoborhydrid zu 30 % Ausbeute, während mit den beiden anderen Methoden Ausbeuten von weniger als 10 % erzielt wurden (vgl. hierzu Abb. 11 S.64).

Herstellung von Aldonsäuren (nach Schaffer und Isbell, 1963):

40 μmol Oligosaccharid wurden in 1 ml Wasser gelöst. Unter ständigem Rühren wurden achtmal je 100 μl 0,1 n Jod-Lösung und 150 μl 0,1 n Natronlauge nacheinander zugegeben. Es wurde jeweils mit der erneuten Zugabe von Jod-Lösung solange gewartet, bis der Ansatz nur noch hellgelb gefärbt war. Nach der letzten Zugabe wurde noch 3 h bei Raumtemperatur gerührt, die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeeengt und die Aldonsäure mittels präparativer Papierelektrophorese isoliert. Die anodisch wandernde Säure wurde mit Wasser eluiert und an

Sephadex G25 chromatographiert. Die Aldonsäure enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Die Ausbeuten an Aldonsäuren betrugen ca. 90 %.

Herstellung von 4-Hydroxyphenyl-Derivaten:

a) Aus Aldonsäuren:

Herstellung von N4-CME (Cyanmethylester der N4-Gluconsäure) (analog Kleinhammer, 1972):

16 mg N4-COOH (23 μ mol) wurden in 300 μ l absolutem DMF gelöst, mit 5 μ l Triäthylamin und mit 3 μ l Chloracetonitril versetzt und 3 h auf dem Ölbad bei 80°C erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Zimmertemperatur abgekühlt und für weitere Umsetzungen des Cyanmethylesters in dieser Form verwendet.

Umsetzung von N4-CME mit Tyramin (analog Kleinhammer, 1972):

7 mg (1,2,4-Triazol und 7 mg Tyramin wurden in 150 μ l DMF und 150 μ l Wasser gelöst. Nach Hinzufügen von 8 μ l Triäthylamin wurde 150 μ l des N4-CME-Ansatzes (siehe oben) dazupipettiert und die Reaktionsmischung drei Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Reinigung erfolgte mittels Papierchromatographie (24 h). Die Zone, die sich sowohl mit Pauly's Reagenz als auch mit dem Reagenz auf Kohlenhydrate anfärben ließ (B-2.1.4), wurde mit Wasser eluiert und an Sephadex G25 chromatographiert. Die N4-Tyr enthaltenden Fraktionen wurden durch Tüpfeln auf Papier und nachfolgendem Anfärben mit Pauly's Reagenz ermittelt, vereinigt und lyophilisiert.

Die Ausbeute an N4-Tyr betrug, ausgehend von N4-CHO, ca. 70 %.

b) Aus 1-Amino-1-desoxy-alditolen:

Acylierung von N4-CH₂-NH₂ mit HPPE zum N4-HPPA (1-[3-(4-Hydroxyphenyl-)propionyl]-amido-1-desoxy-alditol von N4-CHO) (Himmelspach et al., 1977):

Reagenzlösung: 1 mg HPPE (3-(4-Hydroxyphenyl-)propionsäure-N-succinimidester; ICN, Cleveland, Ohio) wurde in wenigen Tropfen Äthanol gelöst und mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt.

100 μ l einer wässrigen Lösung von N4-CH₂NH₂ (1 mg/ml) wurden mit 100 μ l BSB und 50 μ l Reagenzlösung versetzt und 15 min in Eiswasser gestellt.

N4-HPPA wurde nicht isoliert, sondern der gesamte Ansatz wurde unmittelbar anschließend für die Radiojodierung nach der Chloramin-T-Methode verwendet.

Radiojodierung von N4-HPPA (Himmelspach et al., 1977):

- Reagenzlösungen:
- (A) Chloramin-T-Lösung (2 mg/ml in Wasser)
 - (B) Natriumdisulfit-Lösung (2,4 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ /ml Wasser)
 - (C) $\text{Na } ^{125}\text{J}$ -Lösung, trägerfrei, 100 mCi/ml (Amersham-Buchler, Braunschweig)

Zu dem frisch bereiteten Ansatz von N4-HPPA (s.o.) wurden 3 μl (C) und nach 5 min 50 μl (A) hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach weiteren 5 min durch Zupipettieren von 100 μl (B) beendet. Nach Auftrennung des Reaktionsgemisches durch Chromatographie an Sephadex G25 wurden 25 μl jeder Fraktion in einem Packard-Auto-Gammaspektrometer Modell 3002 ausgezählt und die radioaktiven Fraktionen in Farr-Bindungstest und Gleichgewichtsdialyse (B-3.1.6, S.36 und 36) getestet.

Zur Chromatographie siehe Abb.13 , S.67 .

Herstellung von Dansylhydrazonen:

- Reagenzlösungen:
- (A) Zu 10 ml absolutem DMF werden 50 μl konzentrierte Salzsäure gegeben.
 - (B) 60 mg Dansylhydrazin (Fluka, Buchs, CH) werden in 600 μl absolutem DMF gelöst.

30 μmol Oligosaccharid wurden in einem kleinen Schliffreagenzglas in 2 ml (A) gelöst und 500 μl (B) hinzugefügt. Das Reagenzglas wurde, gut verschlossen, 75 min bei 80°C erhitzt. Nach Abkühlen wurde der Ansatz mittels präparativer Papierelektrophorese (6 - 8 h) aufgetrennt. Die intensiv gelb fluoreszierende Zone mit geringer Mobilität in Richtung Kathode wurde nach Trocknen des Papiers ausgeschnitten, gut mit Wasser eluiert, das Eluat am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeengt und auf vorgewaschenem Papier chromatographiert (16 h). Die intensiv gelb-fluoreszierende Zone mit dem geringsten R_f -Wert ließ sich auf Kohlenhydrate anfärben und enthielt das Oligosaccharidhydrazon. Diese Zone wurde ausgiebig mit Wasser eluiert, das Eluat am Rotationsverdampfer

dreimal mit Wasser zur Trockne eingedampft (zur Vertreibung letzter Pyridinreste) und schließlich in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Ausbeuten an Dansylhydrazonen betrug ca. 40 %.

Wichtig: Während der gesamten Präparation wurde möglichst jegliche Einwirkung von Licht (insbesondere von Tageslicht) verhindert, um photolytische Zersetzungen der Dansylderivate zu vermeiden. Die dansylierten Oligosaccharide wurden im Dunkeln bei -20°C aufbewahrt.

Zur Charakterisierung der dansylierten Oligosaccharide siehe C-1.4 (S.71).

B-3 Gewinnung, Isolierung und Charakterisierung von MOPC 104E IgM:

B-3.1 Gewinnung und Isolierung von MOPC 104E IgM:

B-3.1.1 Transplantation von Plasmacytom MOPC 104E in BALB/c Mäus.

Passage von Spender- auf Empfängertiere:

Nach Abtöten der den Tumor tragenden Balb/c Maus wurde die Haut über dem Brustraum aufgeschnitten und das nun im Achselbereich der Vordergliedmaßen freiliegende solide Tumorgewebe mittels Knopfschere und chirurgischer Pinzette herausgeschält. Der Tumor wurde in eine kleine Schale mit PBS gelegt, von nekrotischen Teilen und anhaftendem Bindegewebe befreit. Mit einer Schere wurde er in kleine Stücke geschnitten, durch ein engmaschiges Metallsieb ($1000 \text{ Maschen/cm}^2$), das in einer Petrischale mit PBS lag, gedrückt und homogenisiert.

Die entstandene Zellsuspension wurde in einer International PR6-Kühlzentrifuge (International Equipment Co, Needham Hts, Mass., U.S.A.) bei 4°C und 1800 rpm 10 min zentrifugiert. Hierbei sedimentierten die Tumorzellen. Der Überstand wurde abdekantiert, das Sediment in wenig PBS vorsichtig aufgeklopft, mit weiterem PBS versetzt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal wiederholt.

Die Tumorzellen wurden in kaltem PBS aufgenommen und die Konzentration an intakten Zellen nach Verdünnen und Anfärben der Zellsuspension mit Trypanblau in einer Zählkammer nach Neubauer (Auszählen von mindestens 10 Feldern zu je $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^3$) ermittelt.

Die Konzentration berechnet sich nach:

$$\text{intakte Zellen/ml Suspension} = \frac{\text{Anzahl Zellen/Feld} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{4 \times 10^{-6}}$$

Die Zellsuspension wurde mit PBS auf ca. 50×10^6 Zellen/ml eingestellt und unmittelbar anschließend den für die Passage vorgesehenen BALB/c Mäusen subkutan in die rechte Axilla gespritzt (pro Maus ca. 5×10^6 Zellen, d. h. 0,1 ml Zellsuspension).

Einfrieren von Tumorzellen:

Analog der oben beschriebenen Methode wurde unter sterilen Bedingungen eine Suspension der Tumorzellen in Eagle's und Hepes Medium (MEM Gibco Nr. 237 BCK Biocult-Chemie, Karlsruhe) hergestellt. Zu dieser Zellsuspension wurden 10 Vol-% fötales Kälberserum (Serva, Heidelberg) sowie 10 Vol-% DMSO zugesetzt. Die Zellsuspension (ca. 10×10^6 Zellen/ml) wurde in mehreren kleinen Portionen auf sterilisierte Plastikröhrchen verteilt, in einen Styroporblock eingebettet und in einem Tiefkühlschrank langsam auf -18°C abgekühlt. Am nächsten Tag wurde der Styroporblock mit den eingefrorenen Zellsuspensionen in einer Tiefkühltruhe (-70°C) weiter heruntergekühlt (2 Tage), bevor die Proberöhrchen schließlich in einem Tank mit flüssigem Stickstoff zur Aufbewahrung kamen.

Passage aus eingefrorenen Tumorzellen:

Die eingefrorene Zellsuspension wurde in warmen Wasser schnell aufgetaut und die Tumorzellen, wie oben beschrieben, mehrmals mit kaltem PBS gewaschen, gezählt und den Mäusen injiziert.

Anmerkung: Neuere detaillierte Anleitungen zum Transplantieren und Einfrieren von Plasmacytomen finden sich im "Catalogue of Plasmacytomas and other Tumors of the Lymphoreticular System" von Litton Bionetics, Kensington, Maryland (1976), der u.a. in Zusammenarbeit mit M. Potter, NCI, Bethesda, Maryland bearbeitet wurde.

B-3.1.2 Blutentnahme und Serumgewinnung

Etwa 2 - 3 Wochen nach Transplantation in die Balb/c Mäuse hatte der Tumor einen Durchmesser von etwa 5 - 10 mm erreicht und war deutlich sichtbar. Ab diesem Zeitpunkt wurden etwa zweimal pro Woche den Mäusen aus dem Plexus retroorbitalis mit Hilfe eines Hematokrit-Röhrchens 0,5 - 0,7 ml Blut entnommen. Nachdem der Tumor einen Durchmesser von ca. 20 mm hatte (etwa 3 - 5 Wochen nach Passage), wurden die Tiere ausgeblutet (1,0 - 1,5 ml) und durch zervikale Eukleation getötet.

Das Blut jeder Maus wurde separat in kleinen Eppendorf-Gefäßen stehengelassen (1 - 2 h) und das Serum von dem durch Spontagerinnung gebildeten Blutkuchen abzentrifugiert. Die Seren wurden in der Immunelektrophorese (B-3.2.2, S.36) getestet. Die vereinigten MOPC 104E-Seren wurden eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

B-3.1.3 Isolierung von MOPC 104E IgM:

Herstellung von Immunadsorbens Sepharose 2B-BSA-B1355S (Hiramoto et al., 1972):

- a) Partielle Oxidation von Dextran B1355S (analog Sanderson und Wilson, 1971):

100 mg Dextran B 1355S wurden in 10 ml 0.01 M Natriumacetat-Puffer pH 6,0 gelöst und mit 10 mg NaJO₄ versetzt. Nach einstündigem Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch unter mehrmaligem Wechsel des Außendialysates gegen Wasser dialysiert. Anschließend wurde das partiell oxidierte Dextran B1355S durch Lyophilisieren der wässrigen Lösung gewonnen. Die Ausbeute betrug 90 mg.

b) Bromcyan-Aktivierung von Sepharose 2B:

37 ml Sepharose 2B (Gelbett) wurden auf der Nutsche ausgiebig mit Wasser gewaschen, um Konservierungsmittel zu entfernen. Die Sepharose wurde anschließend mit 0,1 M NaHCO_3 -Puffer von pH 11,0 äquilibriert und in diesem Puffer suspendiert. Die Gelsuspension wurde in Eis gestellt. 6,2 g BrCN wurden in 2,5 ml DMF gelöst und das Reagenz langsam unter vorsichtigem Rühren zu der Gelsuspension gegeben. Die Reaktion wurde am pH-Meter verfolgt und der pH durch Titration mit 0,5 M NaOH auf $11,0 \pm 0,2$ konstant gehalten (die Reaktion dauerte etwa 3 h). Anschließend wurde das Gel ausgiebig mit eiskaltem Wasser gewaschen, mit kaltem BSB äquilibriert und eine dünnflüssige Suspension in BSB hergestellt.

c) Bekuppeln der BrCN-aktivierten Sepharose 2B mit Rinder-Serum-Albumin (BSA):

Zu der Suspension von BrCN-aktivierter Sepharose 2B in BSB wurde eine Lösung von 500 mg BSA in 12,5 ml BSB gegeben. Diese Mischung wurde über Nacht bei 4°C langsam gerührt, anschließend in eine kleine Säule gefüllt und mit BSB ausgiebig gewaschen, um alles nicht-gebundene BSA zu entfernen.

d) Bereitung des Adsorbens:

70 mg des partiell oxidierten Dextran B1355S wurden in 7 ml BSB gelöst und zu der BSA-bekuppelten Sepharose 2B in einer Suspension in BSB gegeben. Die Mischung wurde 4 h bei 37°C unter leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurden 5 mg NaBH_4 hinzugefügt, die Gelsuspension noch eine weitere halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt, schließlich in eine kleine Säule gefüllt und mit BSB ausgiebig gewaschen. Die Adsorbenssäule wurde bei 4°C aufgehoben.

Affinitätschromatographie an Sepharose 2B-BSA-B1355S

Vorbereitung:

Aufgetautes MOPC 104E-Serum wurde in der Tischzentrifuge 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und vom Sediment getrennt. Die Immunadsorbenssäule wurde sukzessiv mit BSB und Gly/HCl gewaschen und erneut mit BSB äquilibriert.

Durchführung:

Das zentrifugierte Serum (bis zu 1 ml/5 ml Gelbett) wurde auf die Adsorbenssäule aufgetragen. Sobald es in das Gel eingesickert war, wurde mehrfach mit BSB die Glaswandung der Säule oberhalb des Adsorbens sehr gut nachgespült, um eine Adhäsion von Serumproteinen am Glas zu vermeiden. Die Adsorbenssäule wurde so lange mit BSB ge-

waschen, bis die Transmission des Eluates wieder den gleichen Wert wie vor der Chromatographie zeigte. Das adsorbierte MOPC 104E IgM wurde mit Gly/HCl eluiert. Dabei wurden Fraktionen von 6 ml in Glasröhrchen aufgefangen, in denen 3 ml BSB vorgelegt war. Auf diese Weise wurde das saure Eluat sofort neutralisiert. Nach beendeter Elution wurde die Adsorbenssäule wieder mit BSB äquilibriert und bei 4°C bis zum nächsten Gebrauch aufgehoben.

Während der gesamten Chromatographie wurde die Transmission des Eluates bei 280 nm mittels eines Uvicord II (LKB, Stockholm) registriert, oder es wurde die Extinktion der einzelnen Fraktionen mit einem Zeiss PMQ II Spektrophotometer gemessen.

B-3.1.4 Handhabung von MOPC 104E IgM-Lösungen:

Aufbewahren der Proteinlösung:

MOPC 104E IgM-Lösung wurde so, wie sie nach der Affinitätschromatographie vorlag (in Puffergemisch aus BSB und Gly/HCl mit pH 7,0 - 7,5), bei 4°C in Glasgefäßen aufbewahrt.

Umpuffern:

Alle Messungen mit MOPC 104E IgM wurden in PBS durchgeführt (mit Ausnahme der Gleichgewichtsdialyse mit N4-HPPA, s. B-3.2.2, S.36). Das Umpuffern geschah entweder durch mehrmaliges aufeinanderfolgendes Konzentrieren und Verdünnen mit dem gewünschten Puffer, oder durch mehrfache Dialyse in Cellulose-schläuchen (Union Carbide, Chicago) gegen den gewünschten Puffer.

Konzentrieren von Proteinlösung:

MOPC 104E IgM-Lösung wurde nach verschiedenen, im folgenden aufgeführten Methoden konzentriert:

- a) Mit Überdruck (0,8 - 1,2 atü) in einer Amicon M12-Zelle mit Diaflo XM 300 Membranfilter (Amicon, Witten/Ruhr). Anstelle des handelsüblichen Kunststoffzylinders wurde ein speziell angefertigter Glaszylinder verwendet. Der Teflonrührer im Innern der Zelle wurde entfernt und die Proteinlösung hin und wieder während der Konzentrierung geschüttelt.

- b) Mit Unterdruck (Wasserstrahlvakuum) in Cellulose-Dialysesläuchen (Union Carbide, Chikago), die zuvor 10 min in Wasser gekocht wurden, oder in Kollodiumhülsen 'Selectron' (Schleicher & Schüll, Dassel).
- c) Durch Resorption von Puffer in Minicon B15-Zellen (Amicon, Witten/Ruhr).
Es wurde nach den Anweisungen in der Bedienungsanleitung verfahren. Zusätzlich wurden die Zellen unmittelbar vor Benutzung dreimal mit Puffer gespült, um Konservierungsstoffe von der Membran zu entfernen (pers. Mitteilung von B. Geiger, Weizmann-Institute of Science, Rehovot, IL).
- d) Durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat und anschließender Dialyse.
Aus MOPC 104E IgM-Lösung wurde das Immunglobulin durch Hinzufügen eines gleichen Volumenteils kalt gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt. Nach 10minütigem Stehen in der Kälte (4°C) wurde abzentrifugiert und das Präzipitat quantitativ in einen Dialyseschlauch (Union Carbide, Chikago) gefüllt. Dieser wurde unmittelbar über dem Präzipitat verknotet und das Ammoniumsulfat quantitativ gegen den gewünschten Puffer herausdialysiert.

B-3.2 Charakterisierung von MOPC 104E IgM:

B-3.2.1 Physikalische Methoden:

Konzentrationsbestimmung: (Konzentrationsangaben in molar (m) oder normal (n) beziehen sich auf ein Molekulargewicht von MOPC 104E IgM von 900 000 und eine Valenz von 10):

a) Extinktionsmessung am Cary 118 oder Zeiss PMQ II Spektrophotometer:

$$c = \frac{E_{280 \text{ nm}} \cdot 10}{E_{280 \text{ nm}}^{1\%} \cdot d}$$

$E_{280 \text{ nm}}$: gemessene Extinktion der Lösung bei 280 nm

$E_{280 \text{ nm}}^{1\%}$: Extinktion einer 1 %igen Lösung des Proteins bei 280 nm bei $d = 1 \text{ cm}$

d : Schichtdicke der Messküvette in cm

c : Proteinkonzentration in mg/ml

$E_{280 \text{ nm}}^{1\%}$ (MOPC 104E IgM) = 16,0 (Leon et al., 1970)

b) Folin-Test (Lowry et al., 1951):

Reagenzlösungen:

(A) 4 g NaOH,
20 g Na_2CO_3 und
200 mg Natriumtartrat werden in
1 l H_2O gelöst.

(B) 500 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ werden in
100 ml H_2O gelöst.

(C) Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck, Darmstadt)

Durchführung

Vor Ausführung der Proteinbestimmung wurden 10 ml (A) mit 0,2 ml (B) gemischt.
Von dieser Mischung wurden 750 μl zu 75 μl Probelösung gegeben, intensiv gemischt und nach 20minütigem Stehen bei Raumtemperatur mit 75 μl (C) versetzt. Nach weiteren 20 Minuten wurde die Extinktion bei 750 nm (Zeiss PMQ II) gemessen und der Proteingehalt der Probelösung aus einer Eichkurve (3 - 30 μg Protein/75 μl) abgelesen.

Bestimmung der Sedimentationskonstanten:

Die Sedimentationskonstante $s_{20,w}^0$ von MOPC 104E IgM wurde in einer Beckman Model E Ultrazentrifuge bei 34 000 rpm (An-H-Ti-Rotor, Philpot-Svensson-Optik mit Schlierenwinkel von 60°) bestimmt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE):

a) PAGE in SDS-Flachgelen (Lämmli, 1970):

PAGE in Flachgelen wurde in Gradientengelen, die 0,1 % SDS (Natriumlaurylsulfat) enthielten, durchgeführt. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie in Tris-Puffer pH 6,8 in Gegenwart von 3 % SDS und 10 % Glycerin zwei Minuten gekocht. War die Auftrennung von einzelnen Immunglobulinketten erwünscht, so wurde dem Tris-Puffer noch 5 % 2-Mercaptoäthanol hinzugegeben.

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (120 V) durchgeführt und dauerte etwa vier Stunden. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau.

In jedem Gel liefen Standard-Marker mit:

nicht reduzierendes Gel:		reduzierendes Gel	
Marker	MW (dalton)	Marker	MW (dalton)
Human-IgG	150 000	Phosphorylase	100 000
Phosphorylase	100 000	BSA	68 000
BSA	68 000	γ -Kette	50 000
Ovalbumin	43 000	Ovalbumin	43 000
RNase	14 000	L-Kette	22 500
		RNase	14 000

b) Mikro-Disk-PAGE (Rüchel et al., 1973):

In sehr gut gereinigten 5 μ l-Kapillaren (Brand, Wertheim) wurden durch Kapillarattraktion kontinuierliche Gradientengele mit einem linear ansteigenden Acrylamidgehalt von 1,2 - 30 % (ohne SDS) hergestellt. Nach dem Auftragen der Proteinlösung (ca. 0,5 μ l $\hat{=}$ ca. 3 mm) wurde die elektrophoretische Trennung bei konstanter Spannung (60 V) 20 - 30 min lang durchgeführt. Proteinbanden wurden durch Anfärben der Gele mit Coomassie Brillant Blau sichtbar.

Gelchromatographie:

Chromatographie von IgM wurde an Sepharose-6B (7,1 cm² x 90 cm) in BSB durchgeführt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 15 ml/h und das Fraktionsvolumen 4,5 ml.

Die einzelnen Fraktionen wurden durch Extinktionsmessung bei 280 nm auf den Proteingehalt überprüft.

B-3.2.2 Immunologische Methoden:

Quantitativer Immunadsorbenstest:

10 μ l Immunadsorbens Sepharose 2B-BSA-B1355S (Gelbett, Herstellung siehe B-3.1.3, S.) wurden mit 515 μ l MOPC 104E IgM-Lösung unterschiedlicher Proteinkonzentrationen in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen 15 Minuten lang unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert, das sedimentierte Adsorbens zweimal mit je 250 μ l BSB gewaschen und das in Überstand und Waschpuffer vorhandene Protein mit dem Folin-Test (B-3.2.1) bestimmt.

Zur Desorption des gebundenen IgM wurde dem Sediment 250 μ l 0,1 % Natronlauge zugefügt, intensiv gemischt, zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Desorptionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. In den vereinigten alkalischen Überständen wurde der Gehalt an MOPC 104E IgM mit dem Folin-Test bestimmt.

Immunelektrophorese (Hirschfeld, 1960):

Die Immunelektrophorese wurde in einer Apparatur von Camag (MuttENZ, CH) durchgeführt. Die Gelmatrix bestand aus 1 %iger Agarose Typ HSC (Litex, DK) und die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (260 V) über eine Zeitspanne von 60 - 80 min. Die nach Diffusion der aufgetrennten Proben gegen Antiserum oder Antigenlösung gebildeten Präzipitationslinien wurden gleich photographiert und nach Waschen und Trocknen mit Amidoschwarz angefärbt.

Antiseren: Hammel-anti-Maus-Serumprotein
Ziegen-anti- μ -Ketten

Antigen: Dextran B1355S, 1 %ig

Gleichgewichtsdialyse mit N4-HPPA¹²⁵J:

Gleichgewichtsdialyse von isoliertem MOPC 104E-IgM mit radiojodiertem N4-HPPA wurde im Dianorm-System (Bachofer, Reutlingen) durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml ($\approx 11,1 \times 10^{-6}$ n in Dulbecco's PBS, s. B-1.2, S.13). Die Haptenlösungen lagen im Konzentrationsbereich von 1×10^{-6} m bis 1×10^{-8} m. Zur Gleichgewichtseinstellung wurden die Zellen über Nacht bei 22°C rotiert (Himmelsbach et al., 1977).

Bindungstest nach Farr (Meyer-Delius et al., 1971; Minden und Farr, 1973):

MOPC 104E-Serum wurde schrittweise bis zur Verdünnungsstufe 1 : 10 mit BSB und bei höheren Verdünnungen mit 10 %igem Normal-Mäuseserum in BSB verdünnt. Je 50 μ l dieser Verdünnungen wurden mit 50 μ l einer Lösung von radiojodiertem N4-HPPA (B-2.2.2) in BSB (ca. $3,6 \times 10^5$ cpm/ml) versetzt. Nach einstündigem Stehen

wurden die gesamten Immunglobuline durch Zugabe von 100 µl kaltgesättigter (NH₄),SO₄-Lösung präzipitiert, nach weiteren zwei Stunden abzentrifugiert und die im Überstand verbliebene Radioaktivität (in cpm) gemessen. Gleichbehandelte Proben mit Normalserum dienten als Kontrolle. Der Prozentsatz an Bindung errechnet sich gemäß

$$\% \text{ Bindung} = \frac{\text{cpm}_{\text{Kontrolle}} - \text{cpm}_{\text{Probe}}}{\text{cpm}_{\text{Kontrolle}} - \text{cpm}_{\text{Leerwert}}} \times 100 \quad .$$

B-4 Methoden zur Untersuchung des Hapten-Antikörper-Komplexes:

B-4.1 Statische Untersuchungen:

B-4.1.1 Gleichgewichtsmessungen:

Gleichgewichtsdialyse:

Für die Messung der Assoziationskonstanten mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse wurden Lucite-Zellen von 2 x 150 µl Nenn-Volumen verwendet. Die Membranen wurden aus Cellulose-Dialyseschlauch (Union Carbide, Chikago) hergestellt und vor Verwendung 10 Minuten in Wasser gekocht und gut gespült.

Die Halbzellen wurden jeweils mit 100 µl einer Lösung von tritium-markierten Haptenen (1×10^{-5} bis 5×10^{-4} m in PBS) und 100 µl MOPC 104E IgM-Lösung ($2,22 \times 10^{-5}$ n) beschickt und gut verschlossen. Um jegliche Verdunstung zu verhindern, wurden die Zellen in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Dort blieben sie ohne Bewegung bis nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes (36 h bei 4°C und 24 h bei 24°C; Kontrolle erfolgte in einer mit Hapten und Puffer gefüllten Zelle). Aus jeder Halbzelle wurde ein Aliquot von 25 µl mit einer Hamilton-Spritze entnommen. Nach Hinzufügen von 10 ml Bray'scher Lösung (B-1.2) und anschließendem Mischen wurden die cpm in einem Packard Tri-Carb Modell 3255 gemessen.

Aus den in Dreifachbestimmung gemessenen und gemittelten Counts wurde über Sips- und Scatchard-Plot (vgl. C-3.1.1, S.84) die Bindungskonstante bestimmt.

Verdrängungs-Gleichgewichtsdialyse:

Anordnung und Durchführung entsprachen der normalen Gleichgewichtsdialyse (s.o.) mit dem einen Unterschied, daß anstelle von 100 μl tritium-markierter Haptenlösung in diesem Fall je 50 μl tritium-markierter Oligosaccharidlösung ($1,25 \times 10^{-4} \text{ m}$) mit 50 μl nicht-markierter Oligosaccharidlösung verschnitten wurden. Es wurden Doppelbestimmungen bei jeweils fünf verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ausgeführt.

Die Auswertung erfolgte nach dem bei Licht et al. (1977) beschriebenen Formalismus (s. auch C-3.1.1, S.87). Die Assoziationskonstante für die Bindung der Inhibitoren wurde aus den Einzelbestimmungen durch Mittelwertbildung ermittelt.

Fluorimetrische Titration:

Die fluorimetrische Titration wurde kontinuierlich in einer thermostatisierten $7 \times 7 \text{ mm}$ Fluoreszenzküvette aus Quarz (Hellma Müllheim) durchgeführt. Es wurden 1000 μl Proteinlösung von O.D. = 0,3 (dies entspricht bei MOPC 104E IgM $2,1 \times 10^{-6} \text{ n}$) vorgelegt. Eine ca. $5 \times 10^{-3} \text{ m}$ Lösung von dansyliertem Oligosaccharid wurde aus einer Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, CH) zu der ständig gerührten Proteinlösung hinzutitriert. Der Kolbenvorschub der Hamilton-Spritze wurde durch eine synchron angetriebene Mikrometerschraube so gesteuert, daß das zutitrierte Volumen an Haptenlösung der Titrationsdauer direkt proportional war. Die Verwendung von Hamilton-Spritzen für die Titration ist besonders günstig, da bei diesen der Vorschub des Kolbens um 1 mm genau $1/60$ des Nominalvolumens entspricht.

Während der gesamten Titration (ca. 30 min Dauer) wurde die "intrinsic" Fluoreszenzemission der Proteinlösung bei $340 \pm 5 \text{ nm}$ (Excitation bei $280 \pm 1 \text{ nm}$) mit einem Perkin-Elmer MPF 44A Spektrofluorimeter in der "ratio mode" (Ausgleich von Instabilitäten im anregenden Licht) gemessen und auf einem Schreiber registriert, dessen Papiervorschub dem Kolbenvorschub der Hamiltonspritze synchron war. So konnte die jeder beliebigen Haptenkonzentration zugehörige Fluoreszenzintensität sofort ermittelt werden.

Unter identischen Bedingungen (gleiche optische Dichte der Ausgangslösungen, gleiche Geräteeinstellung sowie Titration mit derselben Haptenlösung) wurden nacheinander zwei Titrations, einmal von MOPC 104E IgM-Lösung und zum anderen von B γ G-Lösung in PBS, durchgeführt, um für den nichtspezifischen Quench zu korrigieren (vgl. C-3.1.1, S.91). Die Auswertung der fluorimetrischen Titration erfolgte auf einer IBM 370/165 Großrechenanlage nach Programmen von D. Lancet und ist in C-3.1.1, S.91 genauer beschrieben.

B-4.1.2 Bestimmung von Fluoreszenzeigenschaften der gebundenen Haptene:

Fluoreszenzspektroskopie:

Fluoreszenzspektren von N3-Dns und N4A-Dns (frei in Puffer, 50 %igem Äthanol und DMF sowie in einer MOPC 104E IgM-Lösung von 9 mg/ml) wurden in einem Perkin-Elmer MPF 44A Spektrofluorimeter bei $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ registriert ($E_x = 325 \pm 1,5 \text{ nm}$, $E_m = 400 - 600 \text{ nm}$ bei 5 nm Spaltbreite).

Linearpolarisation der Fluoreszenz:

Messungen zur Linearpolarisation der emittierten Dansyl-Fluoreszenz in den dansylierten Oligosacchariden wurden in einem analog dem bei Weber und Bablouzian (1966) beschriebenen Instrument durchgeführt (Shinitzky, 1974), dessen Funktionsweise in Abb. 3 schematisch dargestellt ist:

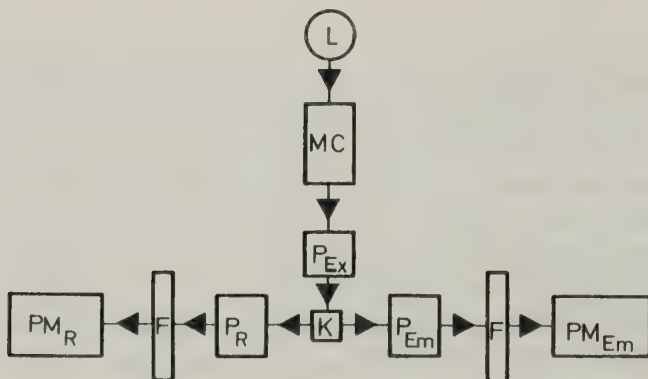


Abb. 3 : Schematische Darstellung des Fluorimeters zur Messung der Fluoreszenz-Anisotropie r

Symbole: L Lichtquelle (Quecksilber-Hochdrucklampe)
 MC Monochromator (Heath EU-700)
 P Polarisator (Glan-Thompson)
 K Küvette (1 x 1 cm Quarzküvette, Hellma; thermo-
 statisiert)
 F Filter (418 nm Absperr-Filter, Schott)
 PM Photomultiplier (EMI 9558 QB)

Licht einer ausgewählten Wellenlänge (365 nm) wird durch den Polarisator P_{Ex} linear polarisiert und regt die in der thermostatisierten Küvette K befindliche Probe zur Fluoreszenz an. Im sogenannten "Emissions-Strahlengang" (Index Em) wird die emittierte Lichtintensität gemessen, deren Polarisationsrichtung parallel ($I_{||}$), im "Referenz-Strahlengang" (Index R) diejenige, deren Polarisationsrichtung rechtwinklig zum anregenden, linear-polarisierten Licht gerichtet ist ($I_{\perp}$).

Registriert wurde direkt das Verhältnis der beiden Emissionsintensitäten $I_{||} / I_{\perp}$, das über die Beziehung

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{||} / I_{\perp} - 1}{I_{||} / I_{\perp} + 2}$$

in direktem Zusammenhang mit der Fluoreszenz-Anisotropie r steht.

Messungen der Fluoreszenz-Anisotropie der dansylierten Oligosaccharide, sowohl frei in PBS als auch an MOPC 104E IgM gebunden, wurden bei 4°C und 25°C durchgeführt.

Aus den Anisotropien für das Hapten in Abwesenheit (r_{frei}) und Anwesenheit von Antikörper (r_{obs}) wurde die Fluoreszenz-Anisotropie des gebundenen Haptens (r_{geb}) über die Beziehung

$$r_{\text{obs}} = \frac{[H]}{[H_t]} r_{\text{frei}} + \frac{[AbH]}{[H_t]} r_{\text{geb}}$$

bestimmt, in der $[H_t]$, $[H]$ und $[AbH]$ die Konzentrationen an Hapten insgesamt, an freiem sowie an gebundenem Hapten darstellen. Die beiden letzteren Konzentrationen wurden mit Hilfe der aus den fluorimetrischen Titrations erhaltenen Gleichgewichtskonstanten berechnet. Die Maximalwerte der Fluoreszenz-Anisotropie (r_{max}) der einzelnen Haptene wurden bei 4°C in Glycerin bestimmt.

Zirkularpolarisation der Fluoreszenz (CPL):

Messungen der Zirkularpolarisation der Fluoreszenzemission wurden auf einem Instrument, das am Weizmann Institute of Science (Rehovot, IL) gebaut wurde (Steinberg und Gafni, 1972; Gafni et al., 1973) durchgeführt.

Das CPL-Spektrum der dansylierten Oligosaccharide, in Abwesenheit und Gegenwart von MOPC 104E IgM, wurde nach Excitation bei 365 nm (Hg-Hochdrucklampe) zwischen 450 und 600 nm bei Raumtemperatur gemessen. Die Haptenkonzentration betrug 9×10^{-5} m, die Proteinklösung war $1,5 \times 10^{-4}$ n.

Unter diesen Bedingungen waren 45 - 80 % des Haptens gebunden.

B-4.2 Kinetische Untersuchungen

B-4.2.1 Reaktionskinetische Messungen mit dem Fluoreszenz-Temperatursprungverfahren:

Kinetische Bindungsstudien am System MOPC 104E IgM/dansylierte Oligosaccharide wurden bei unterschiedlichen Bindungsgleichgewichten und verschiedenen Ausgangstemperaturen mit dem

Temperatursprungverfahren (Eigen und De Maeyer, 1963) durchgeführt. Dabei wurden die nach thermischer Perturbation ($\Delta T = +5,3^\circ\text{C}$, verursacht durch eine elektrische Entladung von 20 kV innerhalb ca. 1 μsec) ablaufenden Prozesse durch Aufnahme der Relaxationsspektren mit einem Fluoreszenz-Temperatursprungapparat (Rigler et al., 1974, Abb. 4) verfolgt. Beobachtet wird die vom Bindungsgleichgewicht abhängige Tryptophanfluoreszenz des Proteins.

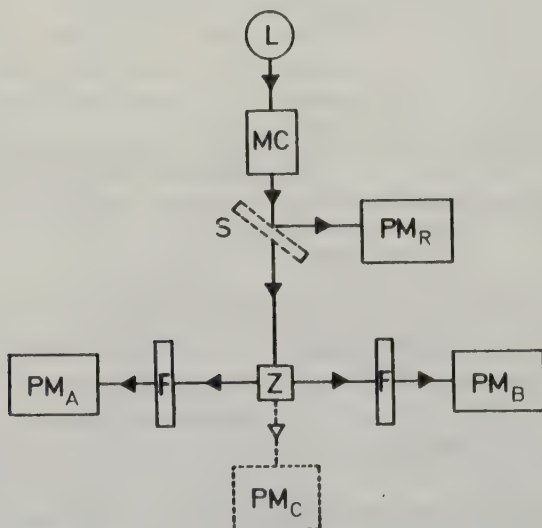


Abb. 4: Schematische Skizze des optischen Aufbaus der verwendeten Fluoreszenz-Temperatursprunganlage:

- Symbole: L Lichtquelle (Hg-Xe-Bogenlampe)
 MC Monochromator (Bausch & Lomb)
 S Strahlenteiler (0,5 mm dicke Quarzplatte)
 Z Temperatursprung-Zelle, extern temperiert
 (7 x 7 mm, ca. 1 ml Volumen)
 F Filter (Interferenz- und Absperr-Filter)
 PM Photomultiplier,
 Index A und B: Zum Messen der Emissionsintensität, wahlweise mit 3 - 11 Dynoden
 Index R: Referenzphotomultiplier
 (Index C: Zum Messen der Transmission) > wahlweise mit 0 - 5 Dynoden

Nach Verstärkung der gemessenen Signale wurden die in den Photomultipliern PM_A und PM_B registrierten Emissionsintensitäten durch das Signal des Referenzphotomultipliers PM_R dividiert (dieses Messen in "ratio mode" unterdrückt weitgehend das Relaxationsspektrum überlagernde Störsignale, die durch Fluktuation in der Lampenintensität hervorgerufen werden). Das Relaxationsspektrum wurde auf einem Oszilloskop (Tektronix 7514 storage oscilloscope) aufgenommen. Nach Analog-Digital-Umwandlung und Zwischenspeicherung (Biomation 802 transient recorder) wurden die Daten des Relaxationsspektrums in einem Hewlett-Packard 2100-A-Computer eingelesen. Dort wurden die einzelnen Daten mehrerer Relaxationsspektren, die alle unter identischen Bedingungen aufgenommen waren, aufsummiert und das daraus resultierende Summationsspektrum sowie verschiedene Kenndaten (File-Bezeichnung, Anzahl der Einzelspektren, Messbereich von Oszilloskop und Biomation in msec und mV, Gesamtsignal in mV, Anfangstemperatur und Entladungsspannung) auf Magnetband geschrieben. Die weitere Auswertung erfolgte an einer IBM-370/165 Großrechenanlage nach Computerprogrammen von Y. Blatt und D. Lancet (Lancet, 1978) und ist in C-3.2.1 (S.115) näher beschrieben.

Im folgenden sind die Bedingungen eines typischen Experiments gegeben:

a) Vorbereitung: PBS wurde nach Sterilfiltration (Gelman Acrodisc) im Unterdruck entgast.

MOPC 104E IgM-Lösung ($1,32 \times 10^{-5}$ n) und N3-Dns-Lösung (2×10^{-3} m in PBS) wurden 15 min bei 4°C mit 15 000 rpm zentrifugiert (Sorvall RC2-B).

b) Zellenfüllung: 930 μl PBS
+ 50 μl MOPC 104E IgM-Lösung
+ 35 μl N3-Dns-Lösung
(entspricht $[Ab_t] = 6,5 \times 10^{-7}$ n und $[H_t] = 96,0 \times 10^{-6}$ m).

c) Instrumenteeinstellung:

Monochromator: Eintrittsspalt 3 mm
Austrittsspalt 2 mm
Excitationswellenlänge 282 ± 4 nm

Emissionsfilter: WG 320 + UG 11
(Schott & Gen., Mainz)

Emissionsbereich: 320 - 400 nm

Dynodenzahl: PM_A und PM_B je 5 Dynoden
 PM_R 2 Dynoden

Messmodus: $\frac{A + B}{R}$ ("ratio mode")

Anfangstemperatur: $2,0 \pm 0,1^\circ C$ (extern thermostatisiert mit Lauda TUK30D)

Anfangssignal: 8000 mV

Entladungsspannung: 20 kV

neue Gleichgewichtstemperatur: $7,3^\circ C$

Trigger-Verzögerung: 20 μsec

Zeitkonstante ("rise-time filter"): 1 msec

Oszilloskop: X-Achse: 100 msec/cm, d.h. 1000 msec
Messzeit

Y-Achse: 20 mV/cm

Biomation: Messbereich: 1024 X-Werte/1000 msec
256 Y-Werte/5000 mV

Verstärkungsfaktor des Y-Signals vom
Oszilloskop: 25

Nach jeder Aufnahme eines Relaxationsspektrums wurden 5 - 10 Minuten gewartet, damit sich das Bindungsgleichgewicht bei der Ausgangstemperatur wieder einstellen konnte. Die Zelle wurde nach maximal 20 durchgeführten Temperatursprüngen mit frischen Lösungen neu gefüllt.

B-5 Methoden zur Untersuchung thermisch induzierter Zustandsänderungen von MOPC 104E IgM:

B-5.1 Optische Methoden:

B-5.1.1 Temperaturdifferenzspektroskopie der UV-Absorption:

Spektralphotometer: Cary 118 als Zweistrahl-Gerät

Einstellung:

Registriermodus: Absorption in Auto-slit-modus

Spektralbereich: 320 $\longrightarrow$ 245 nm

Empfindlichkeit: $0,002 \text{ cm}^{-1}/\text{inch}$

Wellenlängen-Vorschub: 0,02 nm/sec
Papier-Vorschub: 5,0 nm/inch
Zeitkonstante der Dämpfung: 25 sec

Das Küvettenhaus wurde konstant mit trockenem Stickstoff durchspült.

Küvetten: thermostatisierbare 4 x 10 mm Küvetten mit 10 mm Lichtweg und 1 ml Volumen (Nr. 160B-QS, Hellma, Müllheim) in 2 cm-Küvettenhalter mit Abstandshalter und Metallblende (Spaltbreite 3,4 mm)

Thermostatisierung: Je Küvette ein Kryostat (Lauda TUK 30 D) Temperaturkonstanz $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$

Temperaturkontrolle: Mit Thermistoren in den Küvetten, Eigenbau-Abgleichsmeßbrücke des MPI für biophysikalische Chemie (Göttingen)

Küvettenfüllung: Je Küvette 1,0 ml MOPC 104E IgM-Lösung (O.D. 280 = 0,84, d.h. 0,525 mg/ml)

Küvettemperatur: Referenzküvette: $23,1^{\circ}\text{C}$

Probenküvette: Spektren-Nr.	T ($^{\circ}\text{C}$)
1	23,1
2	17,2
3	7,3
4	23,1
5	31,3
6	39,7
7	23,1

Unmittelbar nach jedem aufgenommenen Spektrum wurde der Absorptionswert bei 320 nm erneut registriert. Danach wurde die neue Proben temperatur eingestellt und gewartet, bis in der Küvette die Temperatur mindestens 10 min konstant war (Gesamtdauer ca. 30 min). Während dieser Zeit wurde der Lichtweg zwischen Lampe und Küvette unterbrochen.

B-5.1.2 Zirkulardichroismus:

Messgerät: Cary 60

Einstellung:

Registriermodus: mit automatischem Spaltprogramm
Spektralbereich: (A) 320 $\longrightarrow$ 230 nm
(B) 250 $\longrightarrow$ 205 nm

Empfindlichkeit: 0,004 Grad Elliptizität/inch
Wellenlängen-Vorschub: 0,03 - 0,1 nm/sec
Papier-Vorschub: 7,5 nm/inch
Zeitkonstante der Dämpfung: 0,3 - 1,0 sec

Küvette: 10 x 10 mm Quarzküvette (Hellma, Müllheim)
in thermostatisiertem Küvettenhalter
Thermostatisierung und Temperaturkontrolle
wie bei Temperaturdifferenzspektroskopie
(s. B-5.1.1; S.44)

Küvettenfüllung: MOPC 104E IgM-Lösung
Spektralbereich (A): O.D.₂₈₀ = 1,01
d.h. 0,631 mg/ml
Spektralbereich (B): O.D.₂₈₀ = 0,101,
d.h. 0,063 mg/ml

Küvettemperatur: 1) 8°C
2) 23°C
3) 32°C

Die molare Elliptizität wurde auf das Molekulargewicht eines mittleren IgM-Aminosäurerestes ($\overline{MW} = 107,2$, Ashman et al., 1971) bezogen und aus der gemessenen Elliptizität Θ (in Grad), der Konzentration c (g/100 ml) sowie der Schichtdicke d (dm) nach

$$\left[\Theta \right]_{\lambda}^T = \frac{\Theta \cdot \overline{MW}}{c \cdot d}$$

berechnet.

Durchführung:

Bei jeder Temperatur wurde zuerst ein Spektrum von PBS über den gesamten Bereich (320 - 205 nm) aufgenommen. Dann wurde das Proteinspektrum im Bereich (A) und anschließend im Bereich (B) registriert. Zum Schluß wurde erneut das Pufferspektrum als Nulllinie gemessen. Nach jeder neuen Küvettenfüllung wurde 1,5 h thermostatisiert. Bei jeder Temperatur wurden neue Proteinlösungen benutzt.

B-5.1.3 Optische Rotation:

Messgerät: Perkin-Elmer M 141 Polarimeter
Wellenlänge: 589 nm (Natrium-D-Linie)

Küvette: thermostatisierbare Mikroküvette (l = 0,9999 dm, 1 ml Volumen)

Thermostatisierung mit Kryostat K2R (Lauda),
Temperaturkontrolle wie bei Temperaturdifferenz-
spektroskopie (s. B-5.1.1, S.44)

Küvettenfüllung: MOPC 104E IgM-Lösung (6,0 mg/ml)

Küvettemperatur: Im Bereich von 9 bis 39°C etwa
alle 2°C

Das Küvettenhaus wurde konstant mit trockener Luft
durchspült.

Durchführung:

Ausgehend von der höchsten Temperatur (38,8°C) wurde
stufenweise abgekühlt. Nach 10minütiger Thermostatisie-
rung wurde der Drehwinkel gemessen, anschließend die
Küvette aus dem Polarimeter herausgenommen und visuell
auf das Vorhandensein von Luftblasen oder Schlieren in
der Proteinlösung geprüft, wieder in das Polarimeter
eingesetzt und erneut den Drehwinkel gemessen (dieser
ist identisch mit dem zuerst gemessenen). Nach Erreichen
der niedrigsten Temperatur wurde schrittweise aufge-
heizt und bei den gleichen Temperaturen die Drehwinkel
erneut gemessen und die Probeförderung kontrolliert.

B-5.1.4 Fluoreszenzspektroskopie:

Messgerät: Perkin-Elmer MPF4 Spektrofluorometer

Einstellung: Registriermodus: "ratio mode"

Excitationswellenlänge: 280 ± 1 nm

Emissionswellenlänge: 340 ± 5 nm

Emissionsfilter: 310 nm Absperr-
filter

Küvette: 10 x 10 mm Fluoreszenz-Quarzküvette (Hellma,
Müllheim) von 3 ml Volumen in thermostatisier-
tem Küvettenhalter (Lauda K2R Kryostat)

Temperaturkontrolle: Während der gesamten Messung mit
Thermistor (Telethermometer von
YSI, Yellow Springs, Ohio) in der
Küvette

Schreiber: X-Y-Schreiber von Bryans

X-Achse: Temperatur (1 mV/cm variabel
8,6 mm/°C oder
9,0 mm/°C)

Y-Achse: Fluoreszenzintensität
(20 mV/cm calibriert, 500 mV Offset;
oder
10 mV/cm calibriert, 700 mV Offset)

Das Küvettenhaus wurde während der gesamten Registrierung konstant mit trockener Luft durchspült.

Küvettenfüllung: 3 ml MOPC 104E IgM-Lösung (52,5 µg/ml).
Der Puffer zum Verdünnen wurde vorher im Unterdruck entgast und die verdünnte Proteidlösung sterilfiltriert.

Temperaturprogramm: bedingt durch Energieregler am Kryostaten

Abkühlphase: 41 $\longrightarrow$ 7°C in 40 min (1°C/70 s)
Aufheizphase: 7 $\longrightarrow$ 41°C in 56 min (1°C/100 s)

Durchführung:

Proteinklösung wurde zunächst bei der höchsten Temperatur thermostatisiert. Während mit dem X-Y-Schreiber Temperatur und Fluoreszenzintensität registriert wurden, wurde auf den untersten Temperaturwert abgekühlt. Anschließend wurde wieder die Temperatur in der Küvette kontinuierlich bei gleichzeitiger Registrierung erhöht.

B-5.2 Kalorimetrische Methoden:

Bei den mikrokalorimetrischen Untersuchungen - Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC) sowie Kalorimetrie nach der Methode der abgeglichenen Wärmepulse (balanced heat pulse calorimetry, BHPC) - wurde die in Abb. 5 gezeigte Versuchsanordnung benutzt.

Bei der beschriebenen Versuchsanordnung lag die Nachweisgrenze des Wärmeflusses bei 0,5 µW (isothermer Betrieb) und die des gesamten Kalorimeters bei 30 µcal/min (bei Temperaturprogrammen von 0,5 - 3 Grad/min).

Bei der beschriebenen Versuchsanordnung lag die Nachweisgrenze des Wärmeflusses bei 0,5 µW (isothermer Betrieb) und die des gesamten Kalorimeters bei 30 µcal/min (bei Temperaturprogrammen von 0,5 - 3 Grad/min).

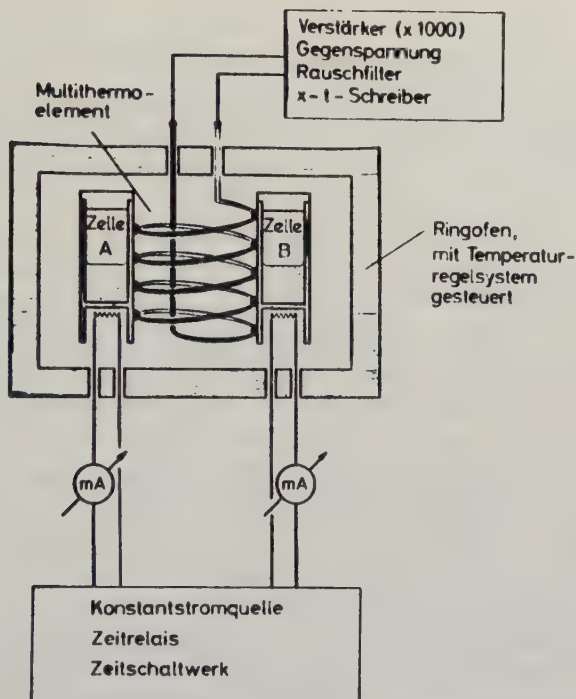


Abb. 5: Schematische Versuchsanordnung zur Mikrokalorimetrie

Wärme fluß-Kalorimeter: optimiertes (Funck und Hoffmann, 1975) Mikrodifferential-Kalorimeter. M.C.B. (Microcalorimetre Typ Barberi, Thermanalyse, Paris), Empfindlichkeit $66 \mu\text{V}/\text{mW}$.

Temperaturregler: Proportional-Integral-Differential-geregelte kontinuierliche Gleichstromheizung *) mit linearen Temperaturprogrammen von $1^\circ\text{C}/\text{h}$ bis $1^\circ\text{C}/\text{min}$.

Verstärkung der Thermospannung: Lichtgechoppter Gleichstromverstärker ($\times 1000$) *); erdfreie Gegenspannung *); Rauschfilter ($0,5 - 100 \text{ Hz}$ Grenzfrequenz) *).

Registrierung: X-t-Schreiber (W+W, Typ 3212, Kontron, Eching)

Eichung bzw. gepulste Heizung: Konstantstromquelle ($0,05 - 9,00 \text{ mA}$) *); Zeitrelais (Mikrorelais-D, Schleicher, Berlin); Normalwiderstand 100Ω (Burster, Gernsbach); Digitalmultimeter Typ DMM 4001 (Kontron, Eching); Zeitschaltwerk Micromat (Mikro-Electric AG, Zürich).

*) Eigenbau des MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen

B-5.2.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie (vgl. C-4.2, S.134)

Im folgenden sind die experimentellen Daten eines typischen DSC-Experiments gegeben:

Zellen: Edelstahl-Zellen mit Teflon-Deckel

Zellfüllung: Zelle A: 359,5 mg PBS

Zelle B: 359,8 mg MOPC 104E IgM-Lösung (0,92 mg IgM/
ml PBS)

Temperaturprogramm: 4°C bis 38°C, mit 1°C/min

(Kalorimetersystem war während des Experiments mit trockenem Stickstoff gefüllt)

Registrierung: 0,1 mV/cm; Papiervorschub: 0,5 cm/min

Eichung: 1800 sec, 0,13 mA (Eichwiderstand 100,0 Ω).

B-5.2.2 Kalorimetrie nach der Methode der abgeglichenen Wärmepulse: (vgl. C-4.2, S.135)

Daten eines typischen Experiments:

Zellen: Edelstahlzellen mit Teflonstopfen

Zellfüllung: Zelle A: 305,2 mg PBS

Zelle B: 305,5 mg MOPC 104E IgM-Lösung (1,02 mg
IgM/ml PBS)

Temperaturprogramm: 4°C - 40°C mit 0,2°C/min (Kalorimetersystem war während des Experiments mit trockenem Stickstoff gefüllt)

Registrierung: 0,1 mV/cm; Papiervorschub 1 cm/min

Heizpulse: 30 sec ca. 1 mA; Abklingphase 570 sec; Konstante
1/A = 12

C HAUPTTEIL

C-1 Zur Gewinnung, Charakterisierung und Derivatisierung
von Oligosaccharid-Haptenen:

C-1.1 Gewinnung von α -(1-3)-Glucan:

Poly-[α -D-Glcp-(1-3)] (α -(1-3)-Glucan) findet sich in der Natur in den Zellwänden verschiedener niederer Organismen, wie z.B. in Schimmelpilzen oder Hefen (Reese et al., 1972; Guggenheim, 1970; Bacon et al., 1968) und kann aus diesen isoliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Polysaccharid, wie bei Johnston (1965) beschrieben, aus dem Mycelium von *Aspergillus niger* gewonnen. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die möglichst quantitative Abtrennung eines zweiten Polysaccharides, Poly-[α -D-Glcp-(1-3)- α -D-Glcp-(1-4)] (Nigeran), gelegt, das in den Zellwänden desselben Pilzes vorkommt (Johnston, 1975). Die Abtrennung erfolgte unter Ausnutzung der unterschiedlichen Löslichkeiten in heißem Wasser: Im Gegensatz zu α -(1-3)-Glucan ist Nigeran in Wasser bei Temperaturen oberhalb 85°C gut löslich, so daß durch mehrfache Heißwasserextraktionen, verbunden mit gelegentlichem Umfällen (Lösen in 1 n Natronlauge und Wiederausfällen durch Neutralisation mit Essigsäure) eine weitgehende Trennung der beiden Polysaccharide vorgenommen werden konnte.

C-1.2 Herstellung der Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe:

Eine ganze Reihe von Methoden sind in der Vergangenheit für die Spaltung von Polysacchariden in Oligomere vorgestellt worden (Pazur, 1970). Für die Herstellung der Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe wählten wir die Methode der ungeschützten sauren Partialhydrolyse, da einerseits Johnston (1965) dieses Verfahren bei dem gleichen Polysaccharid angewandt hatte, und zum anderen, da sich die, in der Regel bessere Ausbeuten versprechende, geschützte Hydrolyse (Painter, 1960; Galanos et al.,

1969) wegen der Unlöslichkeit von α -(1-3)-Glucan bei neutralem (und schwach saurem) pH nicht anwenden ließ.

Johnston erzielte recht gute Ausbeuten an Oligosacchariden eines Polymerisationsgrades n von 2 bis 5, indem er das Polysaccharid zu 50 - 60 % hydrolysierte. Um diesen Hydrolysegrad zu erreichen, mußte er das Polysaccharid nach vorhergehender Formylierung 50 - 60 min mit 0,4 n Schwefelsäure kochen.

Probehydrolysen mit dem von uns isolierten Polysaccharid ergaben, daß unter den gleichen Bedingungen, wie sie bei Johnston beschrieben sind, eine nur 17minütige Hydrolysedauer ausreichend war, um einen scheinbaren Hydrolysegrad von 50 % zu erreichen. Aus diesem Grund wurde auch bei den präparativen Ansätzen die Hydrolysezeit auf 17 Minuten begrenzt. Die im neutralisierten Hydrolysat vorhandenen Oligosaccharide wurden an eine Kohle-Celite-Säule adsorbiert und durch Chromatographie mit einem linearen Wasser-Alkohol-Gradienten eluiert. Der Verlauf einer Chromatographie sowie die dabei erhaltenen Ausbeuten an den einzelnen Oligosacchariden sind in Abb. 6 dargestellt.

Die ab dem Heptasaccharid N7-CHO deutlich verminderte Löslichkeit der Oligosaccharide wird als Grund dafür angesehen, daß es uns nicht gelang, höhere Oligosaccharide in nennenswerten Ausbeuten zu erhalten. Zu einem ähnlichen Schluß kam Miller (1963), der nach Partialhydrolyse von Cellulose auch nur die Oligosaccharide bis zum Polymerisationsgrad $n = 7$ isolieren konnte.

Die von der Kohle desorbierten Oligosaccharide waren papierchromatographisch nicht einheitlich, sondern mit den im Polymerisationsgrad benachbarten Oligomeren verunreinigt. Aus diesem Grund wurden die Oligosaccharide in all den Fällen, in denen sie unmodifiziert zu Messungen benutzt wurden, mittels Papier- und anschließender Gelchromatographie gereinigt.

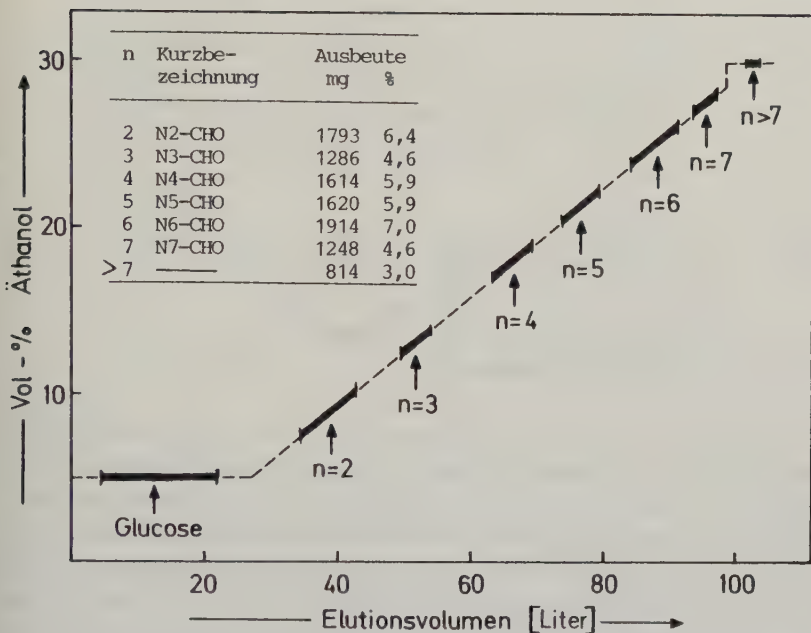


Abb. 6: Chromatographie von α -(1-3)-Glucan-Hydrolysat an Kohle-Celite

Die Adsorptionschromatographie wurde mit einem Hydrolysat, ausgehend von 30 g Polysaccharid, an einer 3,5 l Kohle-Celite-Säule durchgeführt. Die Ausbeuten an den einzelnen Oligosacchariden vom Polymerisationsgrad n sind auf das eingesetzte Polysaccharid mit 11 % Feuchtigkeitsgehalt und unter Berücksichtigung des zur Hydrolyse benötigten Wassers berechnet.

C-1.3 Charakterisierung von Poly- und Oligosacchariden:

Das isolierte Polysaccharid α -(1-3)-Glucan enthielt noch 11 % Restfeuchtigkeit, die mit der Cahn-Waage (Kickhöfen und Warth, 1976) bestimmt wurde. Unter Berücksichtigung des Feuchtigkeitsgehaltes betrug der Kohlenhydratanteil des Polysaccharides 100 % (Bestimmung mit dem Anthrontest, s. B-2.1.6). Das IR-Spektrum war mit dem von Bacon et al. (1968) für α -(1-3)-Glucan beschriebenen praktisch identisch (Abb. 7):

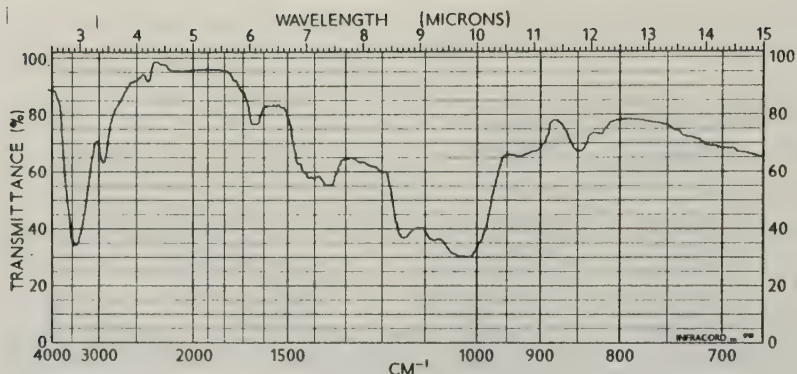


Abb. 7: IR-Spektrum von α -(1-3)-Glucan

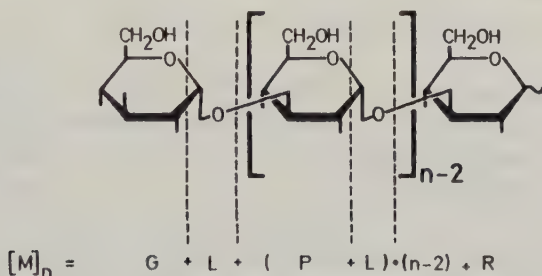
Durch Totalhydrolyse mit anschließender papierchromatographischen Auftrennung des Hydrolysats wurde als einzige im Polysaccharid vorkommende Monosaccharideinheit Glucose gefunden. Weder Mannose noch Galaktose, die in der Präparation von Johnston (1965) zu 1 bzw. 4 % vorkamen, konnten nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen unserer und der Präparation von Johnston besteht auch in den optischen Drehwerten: Während Johnston $[\alpha]_D$ mit $+232^\circ$ angibt (Reese et al., 1972, finden Werte zwischen $+220^\circ$ und $+260^\circ$) betrug die optische Drehung unserer Präparation $[\alpha]_D +276^\circ$. Dieser Wert steht in ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem für das α -(1-3)-Glucan aus den Drehwerten der zugehörigen Oligosaccharide nach der Beziehung von Freudenberg und Blomqvist (1935) extrapolierten Wert von $[\alpha]_D$, theor. $+275^\circ$ (vgl. Tabelle 1 und Abb. 8, S. 61 und 57).

Zur Beziehung zwischen Polymerisationsgrad und molekularem Drehwert

Die sogenannte Freudenberg-Blomqvist'sche Beziehung basiert auf den Hudson'schen Isorotationsregeln, nach denen sich der molekulare Drehwert einer Substanz aus der Summe der Einzeldrehwerte eines jeden Asymmetriezentrums dieser Substanz zusammensetzt. Zwar ist die-

se Regel in ihrer allgemeinen Formulierung nicht uneingeschränkt gültig (Lehmann, 1976); sie läßt sich jedoch auf Oligosaccharide sehr gut anwenden.

Die molekulare optische Drehung eines Oligosaccharides N_n , das ausschließlich aus n ($n \geq 2$) α -(1-3)-verknüpften Glucopyranosen besteht, setzt sich aus den Einzeldrehwerten G , L , P und R folgender Strukturelemente zusammen:



Es gilt: $[M]_{D, N_n} = [\alpha]_{D, N_n} \cdot MW/100$

$$= G + (n-1) \cdot L + (n-2) \cdot P + R$$

wobei G die Partialdrehung des unsubstituierten nichtreduzierenden Endes, L die des anomeren Kohlenstoffatoms 1, P und R die des mittelständigen bzw. reduzierenden endständigen gebundenen Glucopyranoseringes bedeuten. Die Summe $(P + L)$ bildet das molekulare Drehungsinkrement, um das bei Kettenverlängerung um eine Glucoseeinheit die molekulare Drehung des Oligosaccharides zunehmen muß. Für ein Oligosaccharid N_n mit n Glucoseeinheiten ergibt sich ein Molekulargewicht von

$$MW = 180 + (n-1) \cdot 162$$

und somit eine spezifische Drehung

$$\begin{aligned} [\alpha]_{D, N_n} &= \frac{100 \cdot [M]_{D, N_n}}{180 + (n-1) \cdot 162} \\ &= \frac{100 \cdot [G + (n-1) \cdot L + (n-2) \cdot P + R]}{180 + (n-1) \cdot 162} \end{aligned}$$

Hieraus folgt unmittelbar für die spezifische Drehung des linear homologen Polysaccharides mit $n = \infty$:

$$[\alpha]_{D, PS} = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{100 \cdot (G + (n-1) \cdot L + (n-2) \cdot P + R)}{180 + (n-1) \cdot 162}$$

$$= \frac{L + P}{1,62} .$$

Aus $[M]_D = G + (n-1)L + (n-2)P + R$

ergibt sich durch Umformung:

$$[M]_D = (P + L)n - (2P + L - G - R) ,$$

woraus sofort ersichtlich ist, daß in einem Plot von $[M]_D$ versus Polymerisationsgrad die molekularen Drehwerte der Glieder einer polymer-homologen Reihe auf einer Geraden mit der Steigung $(P + L)$ liegen.

Das aus unseren Meßergebnissen mittels linearer Regression errechnete molekulare Drehungsinkrement für die polymer-homologe α -(1-3)-Glucan-Reihe $(L + P) = +446^\circ$ (die Werte von Johnston, 1965, ergeben $+452^\circ$) stimmt sehr gut mit dem aus der spezifischen optischen Drehung des Polysaccharides ermittelten Wert $(L + P) = +447^\circ$ überein.

Weitere Umformung der zuletzt aufgeführten Gleichung ergibt

$$[M]_D = [(2P+L-G-R) + (G+R-P)]n - (2P+L-G-R) .$$

Nach Substitution von $(2P+L-G-R) = A$ und $(G+R-P) = B$ mit

$$(A+B) = (P+L)$$

erhält man $[M]_D = (A+B)n - A$.

Beidseitige Division durch n ($n \neq 0$) ergibt

$$[M]_D = \frac{[\alpha]_D \cdot MW}{100 \cdot n} = (A+B) - A/n$$

$$= A \cdot \frac{n-1}{n} + B .$$

Diese Gleichung liegt der in Abb. 8 gewählten Darstellungsart der Freudenberg-Blomqvist-Beziehung zugrunde, bei der sich die Drehwerte aller Oligomeren sowie des zugehörigen Polymeren in einem linearen, endlichen Plot mit $0 \leq \frac{n-1}{n} \leq 1$ darstellen lassen. Darin nimmt für $\frac{n-1}{n}$ (d.h. $n = \infty$) die Funktion den Wert des molekularen Drehungsinkrementes (P+L) an.

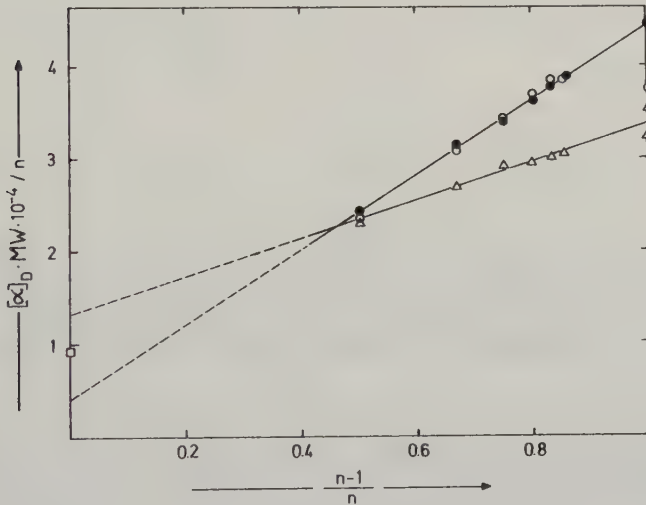


Abb. 8 : Freudenberg-Blomqvist-Plot:

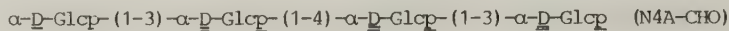
Kreise: Poly- und Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe
 Dreiecke: Poly- und Oligosaccharide der α -(1-4)-Glucan-Reihe
 (Amylose und Maltodextrine)
 Viereck: D-Glucose

Die ausgefüllten Symbole stellen Ergebnisse dieser Arbeit dar,
 die offenen Symbole sind Literaturwerte (Johnston, 1965;
 Whelan et al., 1953).

Das molekulare Drehungsinkrement für die polymer-homologe
 α -(1-6)-Glucan-Reihe beträgt $+300^\circ$ (Turvey und Whelan, 1957)

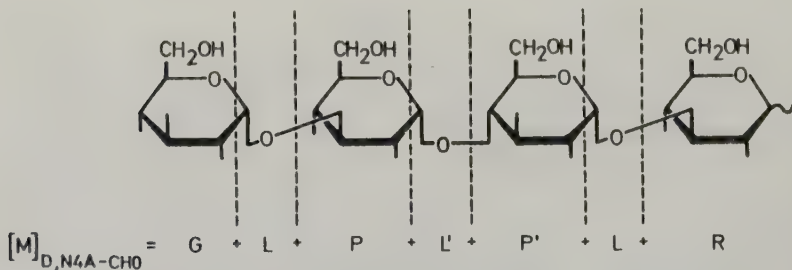
und für die α -(1-4)-Glucan-Reihe $+336^\circ$ (aus den Werten von Whelan et al., 1953, mittels linearer Regression berechnet, vgl. Abb. 8).

Wendet man die Regeln von Hudson zur theoretischen Berechnung der spezifischen Drehung von



an, so sollte sich die molekulare Drehung dieses Oligosaccharides zusammensetzen aus der molekularen Drehung von N3-CHO

$[M]_{D,N3-CHO}$ und dem molekularen Drehungsincrement ($L' + P'$) der Maltose-Reihe:



$$= (G + 2L + P + R) + (L' + P')$$

$$= [M]_{D,N3-CHO} + (L' + P')$$

Setzt man nun die für $[M]_{D,N3-CHO}$ und ($L' + P'$) gefundenen Werte ein, so erhält man

$$\begin{aligned} [M]_{D,N4A-CHO} &= +932^\circ + 336^\circ \\ &= +1268^\circ. \end{aligned}$$

Hieraus folgt: $[\alpha]_{D,N4A-CHO} = +190^\circ.$

In der Literatur (Tung and Nordin, 1968) ist für dieses Oligosaccharid ein spezifischer Drehwert von $[\alpha]_D +181^\circ$ angegeben.

Das von Y. Blatt (Rehovot) durch enzymatischen Abbau von Nigeraan (Tung and Nordin, 1970) isolierte Tetrasaccharid N4A-CHO, das von uns nochmals papier- und gelchromatographisch gereinigt wurde, besitzt, in Übereinstimmung mit den theoretischen Berechnungen, den spezifischen Drehwert $[\alpha]_D + 190^\circ$ (s. Tab. 1).

Zur Beziehung zwischen Polymerisationsgrad und R_f -Wert:

Daß bei den Gliedern einer homologen Reihe ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl n bestimmter Molekülgruppen und $\log [(1/R_f)-1]$ besteht, wurde zuerst von Consden et al. (1944) bei Aminosäuren beobachtet und von Martin (1949) mittels der Theorie zur Verteilungschromatographie gedeutet. Mit Erfolg wurde dieser Zusammenhang von Bate-Smith und Westall (1950) an mehreren homologen Reihen substituierter Aromaten überprüft. In der Folgezeit ist diese Beziehung zwischen R_f -Wert und Polymerisationsgrad immer wieder zur Charakterisierung von polymerhomologen Oligosaccharid-Reihen herangezogen worden (Jeanes et al., 1951; French und Wild, 1953; Whelan et al., 1953; Thoma und French, 1957; Turvey und Whelan, 1957; Teichmann et al., 1971).

Plots von $-\log R_f$ (bzw. $-\log R_{\text{Glc}}$) versus n , wie sie hin und wieder in der Literatur verwendet wurden (z.B. Johnston, 1965), sind streng genommen nicht linear, sondern zeigen nur im Bereich kleiner R_f -Werte eine nahezu lineare Abhängigkeit:

Für sehr kleine R_f gilt:

$$1 - R_f \approx 1 \quad \text{Daraus folgt:}$$

$$\log [(1/R_f)-1] = \log [(1-R_f)/R_f] \approx \log (1/R_f) \approx -\log R_f$$

$$\begin{aligned} \text{und } -\log R_f &= -\log (R_{\text{Glc}} \cdot R_f, (\text{Glucose})) = -\log R_f, (\text{Glucose}) - \log R_{\text{Glc}} \\ &= \text{const} - \log R_{\text{Glc}} \end{aligned}$$

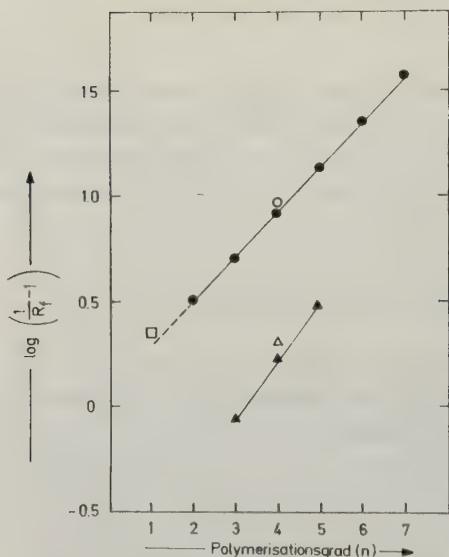


Abb. 9 : Beziehung zwischen R_f -Wert und Polymerisationsgrad von Oligosacchariden und deren Dansylhydrazonen

Kreise: nicht-derivatisierte Oligosaccharide

Dreiecke: Dansylhydrazone der Oligosaccharide

Ausgefüllte Symbole stellen Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe dar, während die offenen Symbole N4A-CHO und N4A-Dns bedeuten

Offenes Viereck: D-Glucose

Auffällig ist in Abb. 8 und Abb. 9, daß D-Glucose weder nach der Freudenberg-Blomqvist'schen Beziehung noch in dem Plot $\log[(1/R_f)-1]$ versus n der polymerhomologen Reihe der α -(1-3)-Glucane angehört. Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen bei den Maltodextrinen überein, anhand derer Whelan et al. (1953) zeigten, daß das kleinste Glied einer polymer-homologen Oligosaccharid-Reihe nicht das Monosaccharid, sondern das Disaccharid ist. Aus den Berechnungen der molekularen Drehung (s. vorhergehenden Unterabschnitt) ergibt sich ebenfalls sofort dieser Befund.

Zusammenfassende Übersicht:

Das isolierte Polysaccharid konnte aufgrund des IR-Spektrums, seiner optischen Drehung sowie seiner Hydrolysenprodukte als α -(1-3)-Glucan identifiziert werden. Die aus ihm gewonnenen Oligosaccharide (Di- bis Heptasaccharid) ließen sich durch ihre molekularen Drehwerte (Erfüllung der Freudenberg-Blomqvist'schen Beziehung, s. Abb. 8, und Übereinstimmung mit den Literaturwerten, s. Tab. 1) sowie ihre R_f -Werte (linearer Plot $\log[(1/R_f)-1]$ versus Polymerisationsgrad n , s. Abb. 9) einer polymer-homologen Reihe aus α -(1-3)-verknüpften Glucoseeinheiten zuordnen. Durch

Tabelle 1: R_f -Werte und optische Drehwerte von α -(1-3)-Glucan und Oligosacchariden

	R_{Glc}	R_f	$\log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$	$[\alpha]_D$ experimentell	$[\text{Grad} \cdot \text{cm}^3 / \text{dm} \cdot \text{Gramm}]$ Lit. a) th. b)	$[M]_D$ [Grad $\cdot \text{cm}^2$ / Dezimol] experimen- th. b) tell
Glucose	1,00	0,310	0,347		+ 52,8	
N2-CHO	0,78	0,242	0,496	+142 (c 0,34 H ₂ O)	+137	+ 486
N3-CHO	0,54	0,167	0,697	+186 (c 0,29 H ₂ O)	+184	+ 932
N4-CHO	0,35	0,109	0,915	+205 (c 0,15 H ₂ O)	+205	+1378
N5-CHO	0,23	0,071	1,115	+220 (c 0,27 H ₂ O)	+223	+1824
N6-CHO	0,14	0,043	1,343	+231 (c 0,30 H ₂ O)	+233	+2770
N7-CHO	0,085	0,026	1,568	+235 (c 0,30 H ₂ O)	+235	+2716
α -(1-3)-Glucan				+276 (c 0,24 n NaOH)	+232	
N4A-CHO	0,32	0,099	0,958	+190 (c 0,57 H ₂ O)	+181	+1265

a) aus Johnston (1965) bzw. Tung und Nordin (1968) (N4A-CHO)

b) Die theoretischen Werte wurden aus dem berechneten molekularen Drehungsinkrement und der optischen Rotation des Disaccharides ermittelt (s. Text).

Partialhydrolyse der einzelnen Oligosaccharide ließen sich ausschließlich die kleineren Homologen sowie als einziger Monosaccharidbaustein Glucose erhalten.

Das Tetrasaccharid N4A-CHO, in dem zwei Nigerosylgruppen mit einer α -(1-4)-glucosidischen Bindung verknüpft sind, zeigt deutlich durch seinen optischen Drehwert und seinen R_f -Wert, daß es nicht Reihe der α -(1-3)-Glucane angehört.

In Tab. 1 ist eine Übersicht über die R_f -Werte und die optischen Drehwerte der Oligosaccharide gegeben.

C-1.4 Derivate der Oligosaccharide:

Für die geplanten Bindungsstudien an MOPC 104E IgM war es notwendig, Haptene mit speziellen Eigenschaften (z.B. fluoreszenz- oder radioaktiv-markierte Oligosaccharide) zur Verfügung zu haben. Diese Eigenschaften wurden den Oligosacchariden durch Anknüpfen von Reportergruppen an das reduzierende Ende verliehen. Modifikationen des reduzierenden Endes sind aus zwei Gründen besonders vorteilhaft: Zum einen ist die Bindungsstelle des MOPC 104E IgM auf das terminale, nicht-reduzierende Ende der Oligosaccharide ausgerichtet, zum anderen läßt sich die im Gleichgewicht vorhandene Aldehydgruppe chemisch leicht modifizieren. Insbesondere bieten sich drei Methoden an, Reportergruppen am reduzierenden Ende der Oligosaccharide zu befestigen:

- 1) Reduktive Aminierung zu dem entsprechenden 1-Amino-1-desoxyalditol und anschließende Umsetzung mit einer NH_2 -reaktiven Reportergruppe.
- 2) Oxidation des reduzierenden Endes zur Carbonsäure, deren Aktivierung, und anschließende Umsetzung mit einer carboxyl-reaktiven Reportergruppe.
- 3) Direkte Umsetzung der Aldehydgruppe mit Carbonylreagenzien.

All diese Methoden wurden für die Derivatisierung der Oligosaccharide im Rahmen dieser Arbeit ausgeführt (s. Abb. 10).

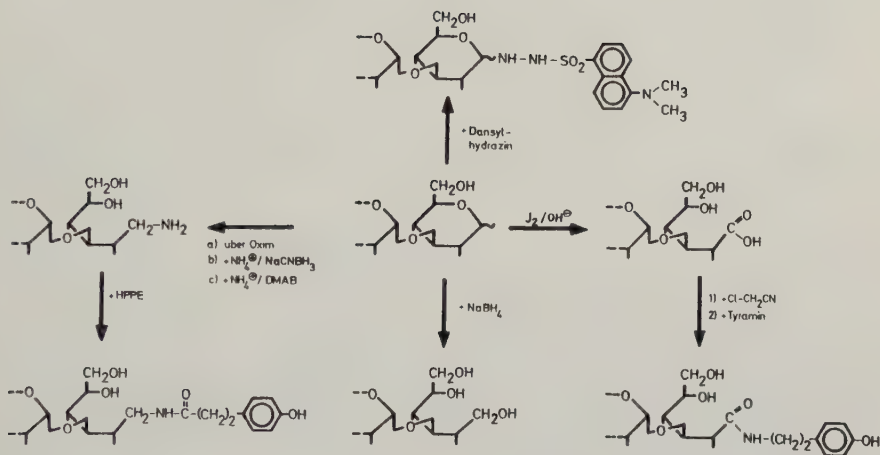


Abb. 10 : Durchgeführte Modifikationen am reduzierenden Ende von Oligosacchariden

1-Amino-1-desoxy-alditole:

Für die schonende Darstellung von 1-Amino-1-desoxy-alditolen der Oligosaccharide bieten sich insbesondere zwei Möglichkeiten an:

- Umsetzung des Zuckers mit Hydroxylamin zu dem entsprechenden Oxim und nachfolgende katalytische Reduktion zum Amin (Kuhn et al., 1937; Pfeleiderer und Nübel, 1960).
- Direkte reduktive Aminierung des reduzierenden Oligosaccharides (Wiegandt und Ziegler, 1974; Himmelspace et al., 1977; Geyer 1977).

Bei der zweiten Methode wurde zur Reduktion der intermediär entstehenden Schiff'schen Base sowohl NaCNBH_3 , als auch Dimethylaminoboran (DMAB) (Billman und McDowell, 1961) verwendet.

Wie in Modellversuchen gezeigt werden konnte (s. Abb. 11) und auch inzwischen bei Geyer (1977) beschrieben ist, brachten bei den Oligosacchariden der Isomaltose-Reihe beide Wege in etwa gleich hoher Ausbeute den gewünschten Amino Zucker. Auffallend ist bei der Verwendung von NaCNBH_3 als reduzierendes Agens

Abb. 11 : Papierelektrophoreogramm verschiedener Ansätze zur Herstellung von 1-Amino-1-desoxy-alditolen.



die Bildung eines weiteren Produktes, das in der Elektrophorese eine geringere kationische Mobilität zeigt als das Amin, und das sich auf Zucker, jedoch nicht mit Ninhydrin anfärben läßt. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Produkt um das sekundäre Amin, das aus Reaktion von bereits gebildetem Amin mit noch unumgesetztem Oligosaccharid entstanden ist.

Für die Herstellung der 1-Amino-1-desoxy-alditole der Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe erwies sich die reduktive Aminierung mit NaCNBH_3 als vorteilhaft: Unter gleichen Reaktionsbedingungen lieferte dieses Agens ca. 30 % Ausbeute, während mit DMAB oder über das Oxim jeweils weniger als 10 % Ausbeute erhalten wurde

(s. Abb. 11). Bei der präparativen Darstellung von $N_4-CH_2-NH_2$ aus N_4-CHO und NH_4Br als Ammoniumkomponente wurde die intermediär entstehende Schiff'sche Base $N_4-CH=NH$ mit $NaCNBH_3$ sofort zum Amin reduziert. Im wesentlichen trat nur ein Nebenprodukt auf, bei dem es sich vermutlich um das sekundäre Amin $N_4-CH_2-NH-CH_2-N_4$ handelt. Hiervon, von nicht umgesetzten Oligosaccharid und Reagenz wurde mittels der präparativen Papierelektrophorese abgetrennt. Das isolierte und getrocknete Amin wurde wegen seiner leichten Zersetzlichkeit an feuchter Luft im Vakuumexsiccator über P_2O_5 aufbewahrt.

Aldonsäuren und deren Aktivierung:

Durch Jodoxidation (Schaffer und Isbell, 1963) lassen sich in hohen Ausbeuten die Aldonsäuren der Oligosaccharide herstellen. Die Isolierung der Aldonsäuren erfolgte papierelektrophoretisch und die Aktivierung wurde durch Überführung der Säure in ihren Cyanmethylester (Kleinhammer, 1972) vorgenommen.

Radioaktive Markierung von Oligosacchariden:

Für die Markierung von reduzierenden Oligosacchariden mit radioaktiven Isotopen boten sich insbesondere zwei Möglichkeiten an:

- a) Tritium-Markierung durch Reduktion der Oligosaccharide mit NaB^3H_4 zum 3H -Alditol (Katz und Pappenheimer, 1969; Young et al., 1971).
- b) Radiojodierung der Oligosaccharide durch deren Überführung in Derivate, die eine Phenolgruppe enthalten, in der anschließend ein Proton durch ^{125}J substituiert wird (Himmelsbach et al., 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Wege der Radiomarkierung beschritten.

Zu a) Die Reduktion von Aldosen mit $NaBH_4$ zu den entsprechenden Alditolen ist eine in der Kohlenhydratchemie sehr verbreitete Methode (Wolfrom und Thompson, 1963). Bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches muß besonderes Augenmerk auf die quantitative Zerstörung des sich bildenden Zucker-Borsäure-Komplexes gelegt werden. Diese Zerstörung geschieht am einfachsten durch mehrmaliges Einrotieren des Ansatzes mit Methanol, wobei die Borsäure in Form des leichtflüchtigen Borsäuremethylesters abdestilliert wird. Das gleiche gilt selbstverständlich bei der Reduktion mit NaB^3H_4 .

Die Alditole N3-CH₂OH und N4A-CH₂OH sowie deren Tritium-markierte Analoga wurden gemäß den oben ausgeführten Richtlinien zur Aufarbeitung nach der bei Young et al. (1971) beschriebenen Methode hergestellt. Die Isolierung des Endproduktes erfolgte mittels Gelchromatographie an Sephadex G15 (s. Abb. 12).

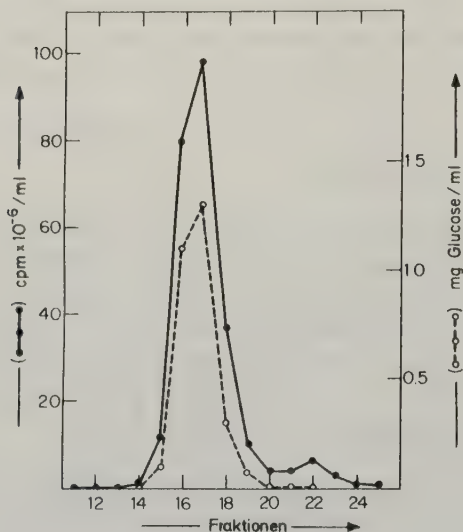


Abb.12 :

Chromatographie von Tritium-markiertem N4A-CH₂OH an Sephadex G15.

Es wurden Fraktionen von 3,0ml aufgefangen. Experimentelle Einzelheiten s. B-2.2.2, S.24

Die Ausbeuten an Alditolen betrugen etwa 90 %. Die spezifische Aktivität betrug bei dem markierten N3-Alditol $2,75 \times 10^{13}$ cpm/Mol und bei N4A-³H-Alditol $5,46 \times 10^{13}$ cpm/Mol.

Zu b) Die Einführung einer Phenolgruppe in ein Oligosaccharid wurde auf zweierlei Wegen durchgeführt:

- i) Umsetzung des aktiven Cyanmethylesters N4-CME mit Tyramin (analog Kleinhammer, 1972).
- ii) Umsetzung des 1-Amino-1-desoxy-alditols N4-CH₂-NH₂ mit dem aktiven 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-N-succinimidester (HPPE) zum Amid N4-HPPA (Himmelspach et al., 1977).

In den Phenolgruppen läßt sich dann leicht mittels der Chloramin-T-Methode (Hunter, 1973) radioaktives Jod einführen.

Bei dem im Eintopf-Verfahren aus $\text{N4-CH}_2\text{-NH}_2$ hergestellten ^{125}J -markierten N4-HPPA konnte durch Gelchromatographie des Reaktionsgemisches an einer kalibrierten Sephadex G25-Säule gezeigt werden, daß alle überschüssigen Ausgangsprodukte sowie entstandene Neben- und Zwischenprodukte hinreichend von dem Hauptprodukt abgetrennt wurden (Abb. 13).

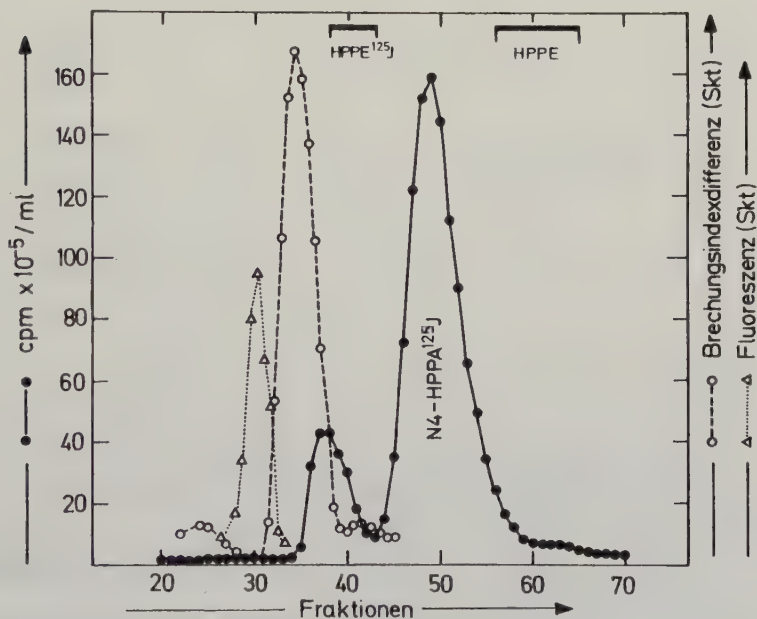


Abb. 13 : Chromatographische Isolierung von $\text{N4-HPPA } ^{125}\text{J}$

Chromatographiert wurde an einer Sephadex G25-Säule (5,7 cm² x 35 cm) mit Wasser (1 %ig an n-Butanol) als Elutionsmittel. Die Fraktionsgröße betrug 4,7 ml.

Die Säule war kalibriert mit $\text{N4-CH}_2\text{-NH}_2$ ($\Delta \cdots \cdots \Delta \cdots \cdots \Delta$, Nachweis mittels Fluramtest), N4-HPPA ($\circ \cdots \cdots \circ \cdots \cdots \circ$), Nachweis durch Differentialrefraktometrie und Pauly's Reagenz), HPPE (Nachweis mit Pauly's Reagenz) sowie $\text{HPPE}^{125}\text{J}$ und Na^{125}J (Nachweis durch Messen von γ -Strahlen).

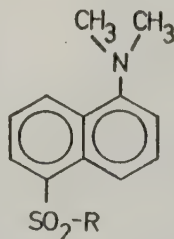
Die Chromatographie des Reaktionsgemisches wurde durch Messung der γ -Strahlen verfolgt ($\bullet \cdots \cdots \bullet \cdots \cdots \bullet$).

Die Fraktionen 35 - 41 und 45 - 54 (die beiden beim Messen der γ -Strahlen beobachteten Peaks) wurden vereinigt und mittels Farr-Test und Gleichgewichtsdialyse (B-3.2.2, S.36) getestet: Nur die in Fraktion 45 - 54 enthaltene Substanz wurde von MOPC 104E IgM gebunden und stellt N4-HPPA- ^{125}J dar, während Fraktion 35 - 41 das nicht reagierte Na ^{125}J enthält (vgl. Himmelsbach et al., 1977).

Fluoreszenz-Markierung von Oligosacchariden:

Als fluoreszierende Reportergruppe für die vorgesehenen Bindungsstudien erschien uns die Dansylgruppe

(5-Dimethylaminonaphthalin-
-1-sulfonyl-)



aus folgenden Gründen besonders geeignet:

- Im Absorptions- (und Excitations-)maximum des Proteins (280 nm) hat das Absorptions- (und Excitations-)spektrum der Dansylgruppe ein Minimum (vgl. Abb. 14).
- Im Emissionsbereich des Dansyl-Fluorophors (400 - 600 nm) findet keine Überlagerung mit Absorptions- oder Emissionseffekten des Proteins statt.
- Der Excitationsbereich (= Bereich der längstwelligsten Absorptionsbande) der Dansylgruppe überlappt optimal mit dem Emissionsbereich der "intrinsic" Proteinfluoreszenz, womit eine wesentliche Voraussetzung für einen Energietransfer zwischen den Fluorophoren des Proteins (vor allem den Tryptophanresten) und der Dansylgruppe gegeben sind (Conrad und Brand, 1968; Parker, 1973; Kuhn, 1977).
- Auf Änderungen in der Polarität ihrer direkten Umgebung reagieren Dansylgruppen sehr empfindlich mit signifikant veränderten Fluoreszenzeigenschaften, wie z.B. der Intensität der Emission und Lage des Maximums (Chen, 1967; Li et al., 1975).
- Die Dansylgruppe eignet sich auf Grund ihres hohen Fluoreszenz-Anisotropiefaktors in viskosem Medium ($r_{\text{max}} > 0,31$, Chen, 1973) gut für Messungen der Linearpolarisation der Fluoreszenz.

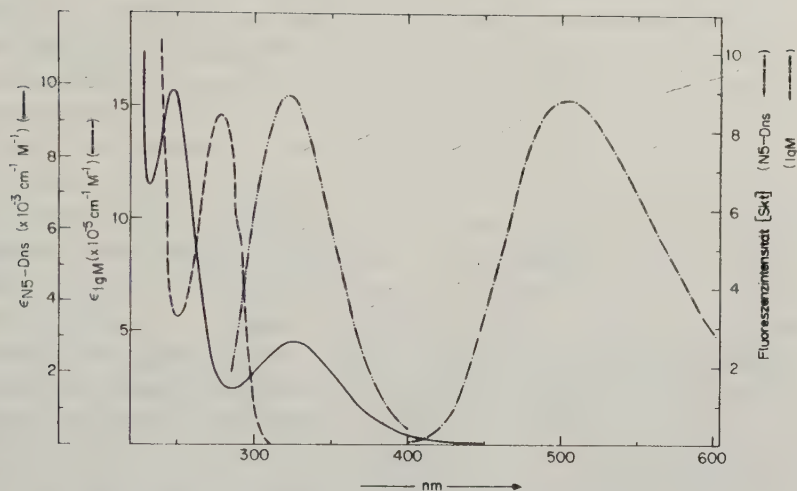


Abb. 14 : Absorptions- und Emissionspektrum von MOPC 104E IgM und N5-Dns

MOPC 104E IgM: - - - - - Absorptionsspektrum
 - · - · - · Emissionspektrum $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \pm 1 \text{ nm}$
 N5-Dns: - - - - - Absorptionsspektrum
 - · - · - · Emissionspektrum $\lambda_{\text{Ex}} = 325 \pm 2 \text{ nm}$

Nachteile aus der Verwendung der Dansylgruppe als Fluoreszenzmarker ergeben sich vor allem infolge der Photolabilität von Dansylderivaten (Seiler und Wiechmann, 1966). Die Photolyse läßt sich jedoch weitgehend einschränken, indem die dansylierten Verbindungen nicht unnötig dem Licht ausgesetzt werden.

Seit den bahnbrechenden Arbeiten von Weber (1952, 1953) wird Dansylchlorid als reaktives Fluoreszenzreagenz für die Fluoreszenzmarkierung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen vielfältig verwendet (Steiner und Edelhoch, 1962; Kirtley und Koshland, 1972; Kanaoka, 1977). Es reagieren vor allem Amino- sowie Phenolgruppen

mit dem Reagenz unter Ausbildung der entsprechenden Sulfonamide bzw. Phenolester (Seiler und Wiechmann, 1966). Aber auch andere funktionelle Gruppen, wie z.B. die alkoholische Hydroxylgruppe in Cholin (Seiler, 1967; Seiler et al., 1969) sowie die Hydroxylgruppen in Kohlenhydraten (Seiler und Wiechmann, 1970) können mit Dansylchlorid reagieren.

Wegen der geringen Selektivität der Kupplungsreaktionen konnte man nicht davon ausgehen, daß bei Umsetzung von 1-Amino-1-desoxyalditolen der Oligosaccharide die Fluoreszenzmarkierung ausschließlich an der primären Aminogruppe stattfindet. Auf der anderen Seite war bekannt, daß Aryl-sulfonylhydrazine mit dem reduzierenden Ende von Kohlenhydraten selektiv zu den entsprechenden Hydrazonen reagieren, ohne daß mit überschüssigem Reagenz Weiterreaktionen zu Osazonen bzw. Osotriazolen stattfinden (Westphal et al., 1954, Zinner et al., 1959; Staněk et al., 1963). Nachdem Graef (1970) und Chayen et al. (1971) unabhängig voneinander Dansylhydrazin für die analytische Fluoreszenzmarkierung der Carbonylgruppen in Keto-Steroiden eingeführt hatten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit dieses Reagenz zur präparativen Herstellung der Dansylhydrazone von reduzierenden Oligosacchariden benutzt. In der Zwischenzeit wurde Dansylhydrazin für die analytische Markierung des Kohlenhydratanteiles von Glycoproteinen angewandt. Die erforderlichen Carbonylgruppen wurden zuvor durch milde Perjodat-oxidation vor allem der endständigen Sialinsäure gebildet (Weber und Hof, 1975; Eckhardt et al., 1976).

Mit dem Tetrasaccharid der Isomaltosereihe (IM4) wurden die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Reaktionsdauer und -temperatur für die präparative Herstellung der Dansylhydrazone ausgetestet. Hierbei wurde der Reaktionsverlauf chromatographisch auf Cellulose-DC-Platten oder Whatman 3MM-Papier, sowie in der qualitativen Papierelektrophorese verfolgt. Als Optimum ergab sich eine 75minütige Reaktionsdauer bei 80°C, HCl-katalysiert in absolutem DMF. Längere Reaktionszeiten führten zum verstärkten Auftreten von nicht weiter untersuchten Nebenprodukten, die zum Teil ebenfalls fluoreszierten.

Auch für die Oligosaccharide der α -(1-3)-Glucan-Reihe sowie für N4A-CHO wurden diese Reaktionsbedingungen als günstig befunden. Für die Isolierung der synthetisierten Oligosaccharid-Derivate aus dem Reaktionsgemisch erwies sich die präparative Papier-Hochspannungselektrophorese mit anschließender Chromatographie auf gewaschenem Whatman 3MM-Papier als vorteilhaft. Im Gegensatz zu anderen Trennmethoden (Säulenchromatographie an Kieselgel, Cellulose oder Sephadex) ergab diese Art der Aufarbeitung ein elektrophoretisch und dünnenschicht-chromatographisch einheitliches Produkt, das sowohl die charakteristische Dansyl-Fluoreszenz besaß als auch mit $\text{JO}_4^-/\text{Ag}^+/\text{OH}^-$ anfärbbar war.

Die R_f -Werte der synthetisierten Dansylhydrazone sind in der absteigenden Papierchromatographie wesentlich höher als die der entsprechenden, nicht-umgesetzten Oligosaccharide (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2: R_f -Werte der Oligosaccharide und ihrer Dansylhydrazone in der absteigenden Papierchromatographie

	R = CHO	R = Dns
N3-R	0,167	0,530
N4-R	0,109	0,372
N5-R	0,071	0,248
N4A-R	0,099	0,332

Die Dansylhydrazone N3-Dns, N4-Dns und N5-Dns lagen als Glieder einer polymer-homologen Reihe in dem Plot $\log[(1/R_f)-1]$ versus Polymerisationsgrad n ebenfalls auf einer Geraden (s. Abb. 9, S. 60 in C-1.3).

Die Absorptions- und Emissionsspektren der dansylierten Oligosaccharide unterschieden sich nicht - auch hinsichtlich ihrer Abhängigkeit vom pH des Lösungsmittels (vgl. Abb. 15) - von denen des Ausgangsreagenzes Dansylhydrazin.

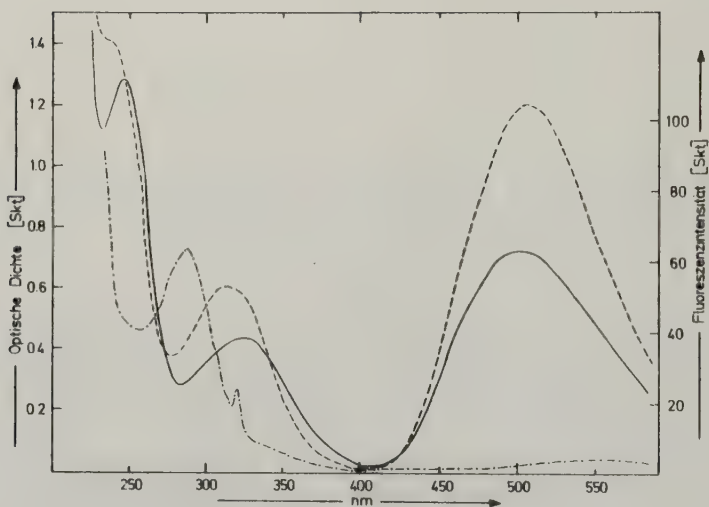


Abb. 15 : pH-Abhängigkeit des Absorptions- und Emissionsspektrums von N4-Dns

Absorptionsspektrum: 220 - 400 nm

Emissionsspektrum: 400 - 600 nm ($\lambda_{\text{Ex}} = 325 \pm 2 \text{ nm}$)

— pH 7
--- pH 9
- · - pH 5

Die pH-Abhängigkeit stimmte überein mit den von Seiler und Wiechmann (1966) für Dansylverbindungen mit saurem Wasserstoff am Amidstickstoff angestellten Beobachtungen und Interpretationen:

- a) Die in alkalischem Medium (pH 9) beobachtete hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande von 326 nm auf 311 nm, sowie die bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums um 5 nm läßt sich auf Grund der Ionisierung der Amidogruppe und der damit verbundenen Mesomerieänderung erklären.

- b) In schwach saurem Medium (pH 5) wird durch die Protonierung der Dimethylaminogruppe im Naphthalinring eine Fixierung der Kekulé-Struktur erzwungen, die sich in einem völlig anders strukturierten Absorptionsspektrum (Hauptmaximum bei 280 nm und scharfe, jedoch weitaus schwächere Nebenbande bei 320 nm), sowie durch eine drastisch herabgesetzte Emissionsintensität ausdrückt.

Die Elementaranalyse, die mit dem dansylierten Tetrasaccharid N4-Dns durchgeführt wurde, bestätigte die erwartete Bruttoformel $C_{36}H_{55}N_3O_{22}S$ (ber.: C 47,31 %, H 6,06 % und N 4,60 %, gef.: C 47,68 %, H 6,12 % und N 4,42 %).

C-2 Zur Gewinnung, Isolierung und Charakterisierung von
MOPC 104E IgM:

C-2.1 Transplantation von MOPC 104E in BALB/c Mäuse:

MOPC 104E Plasmacytom wurde durch subcutane Transplantation von Tumorzellsuspension (s. B-3.1.1, S.28) in BALB/c Mäuse, die entweder aus der Tierzucht des NIH (Bethesda, Md), oder von Jackson laboratories (Bar Harbor, Maine) stammten, übertragen. Während der insgesamt 15 Transplantationsgenerationen wurden weder Veränderungen des Plasmacytoms noch der Myelomprotein-Produktion festgestellt. Es zeigte sich jedoch, daß BALB/c Mäuse des Zentralinstituts für Versuchstierzucht in Hannover-Linden, sowie der Zuchtanstalten in Bomholtgard (Ry, Dänemark) und London keine geeigneten Empfängertiere für MOPC 104E darstellten: Während subcutane Transplantation von $5-10 \times 10^6$ Tumorzellen in Mäusen des NIH oder von Jackson innerhalb 3 - 5 Wochen zu einem soliden Tumor von ca. 20 mm Ø und einer durch das Myelomprotein deutlich erhöhten γ M-Fraktion im Serum führte, zeigten BALB/c Mäuse aus Hannover, Dänemark oder London, in die das Plasmacytom unter gleichen Bedingungen transplantiert wurde, selbst nach mehreren Monaten keine Anzeichen für Tumorwachstum oder Myelomprotein-Produktion. Möglicherweise liegt der Grund hierfür in genetischen Unterschieden der BALB/c Inzuchtstämme der einzelnen Tierzuchtanstalten, die sich im Laufe der isolierten Inzucht ausgebildet haben und wodurch die einzelnen Stämme untereinander nicht mehr syngam sind.

Das Serum von MOPC-104E-tragenden Mäusen enthielt eine, vergleichsweise zum normalen BALB/c Serum, deutlich erhöhte γ M-Fraktion, die sowohl mit anti- μ -Antiserum als auch mit Dextran B1355 S als Antigen eine einzige Präzipitationsbande in der Immunelektrophorese ausbildete (Abb. 16 , 1b, c).

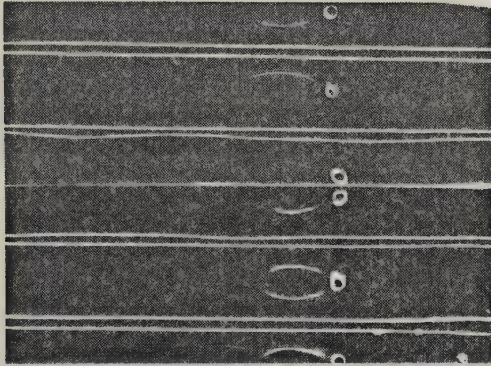


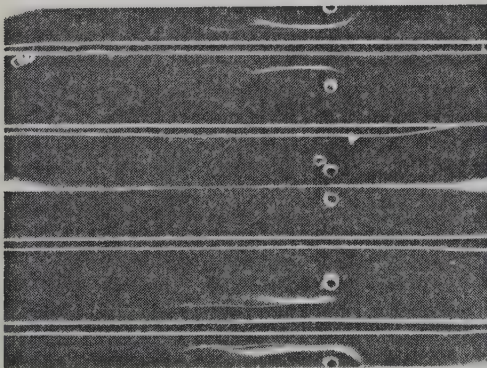
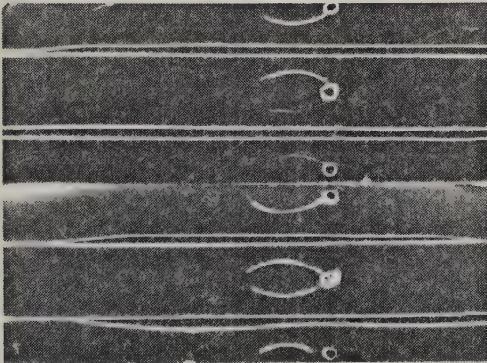
Abb. 16 :

Immunelektrophorese von MOPC 104E

Je 1,5 μ l von MOPC 104E-Serum
(1), MOPC 104E IgM-Lösung
(6 mg/ml) (2) und das auf das
Auftragsvolumen konzentrierte
nicht-adsorbierte Eluat von der
Affinitätschromatographie (3)
wurden elektrophoretisch getrennt
und anschließend mit

a) Hammel-anti-Gesamtmaus-Anti-
serum

b) Dextran B1355S (10 mg/ml) und
c) Ziegen-anti- μ -Ketten-Antiserum
immunpräzipitiert.



C-2.2 Isolierung von MOPC 104E IgM

Das Myelomprotein wurde aus dem Serum mittels Immunadsorption an Sepharose 2B-BSA-B1355S (s. B-3.1.3, S.31) mit anschließender Elution bei pH 2,8 isoliert (Hiramoto et al., 1972).

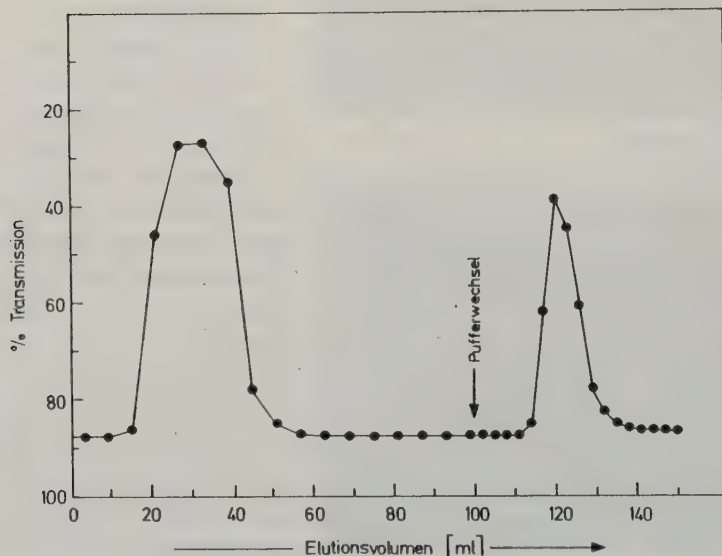


Abb. 17: Affinitätschromatographie von MOPC 104E-Serum an Sepharose 2B-BSA-B1355S

C-2.3 Kapazitätsbestimmung des Immunadsorbens:

Maximalkapazität der Adsorbenssäule:

Zur Gesamtkapazitätsbestimmung wurde an einer kleinen Immunadsorbenssäule (2 ml Gelbett in einer 2 ml Einmalspritze) MOPC 104E Serum (2 ml) chromatographiert und das gebundene IgM (6,2 mg

mit Gly/HCl desorbiert. Die Fraktionen, die das nichtgebundene Serumprotein enthielten, wurden erneut an der Adsorbenssäule chromatographiert. Auch hierbei konnten 6,0 mg IgM vom Adsorbens eluiert werden. Ein nochmaliges Auftragen der nichtgebundenen Fraktionen ergab nach Elution 2,7 mg adsorbiertes IgM. Die nicht-gebundenen Fraktionen wurden mittels Vakuumdialyse auf 1,5 ml eingeengt und zeigten sich in der Immunelektrophorese frei von Myelomprotein (Abb. 16,3, S.75). Eine Wiederholung des Versuches mit 2 ml des gleichen Serums ergab dieselben Ergebnisse:

- a) Bei der Affinitätschromatographie ließen sich bis zu 3 mg IgM/ml Adsorbens isolieren.
- b) Aus dem MOPC 104E Serum ließen sich mittels Immunadsorption an Sepharose 2B-BSA-B1355S 7,5 mg IgM/ml Serum isolieren.

Quantitativer Immunadsorbenstest (vgl. B-3.2.2, S.35):

Kleine Volumina Immunadsorbens wurden mit bestimmten Volumina IgM-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das nichtgebundene IgM im Überstand quantitativ mittels Folin-Test (B-3.2.1, S.34) bestimmt. Nach Dissoziation des gebundenen Immunglobulins mit n Natronlauge wurde auch dieses IgM quantitativ ermittelt. In Abb.18 sind die Verhältnisse zwischen gebundenem und ungebundenem IgM bei den verschiedenen Ausgangsbedingungen dargestellt. Nach dieser Methode wurde als Maximalkapazität des Immunadsorbens (bei großem Proteinüberschuß) 4 mg IgM/ml Adsorbens ermittelt. Aus Summation der Kurven des gebundenen und nichtgebundenen IgM in Abb.18 ist ersichtlich, daß nahezu alles vom Adsorbens gebundene Immunglobulin mit der Natronlauge desorbiert wurde.

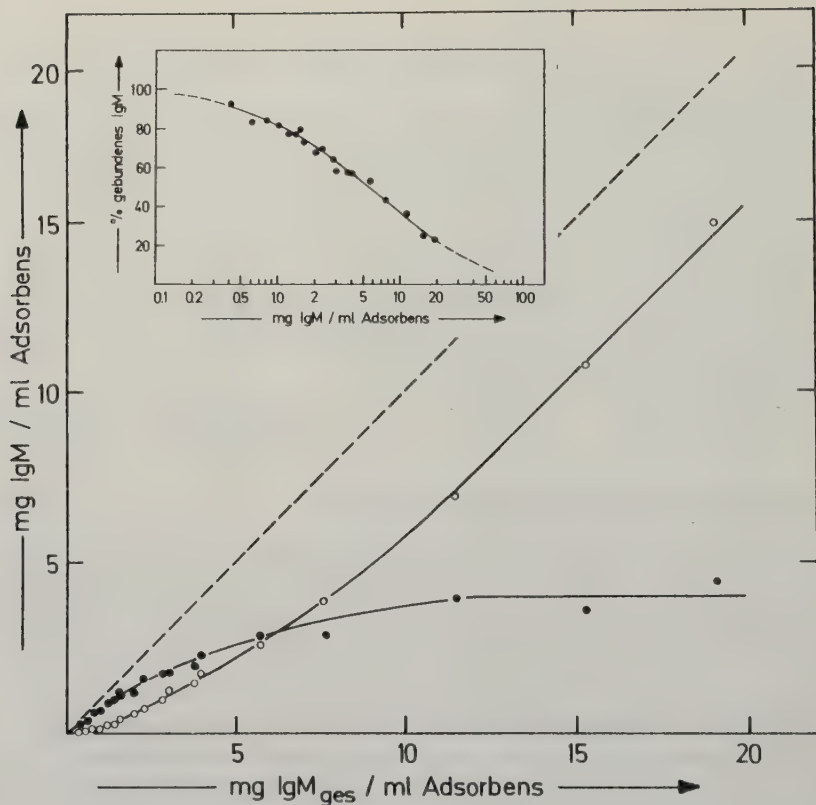


Abb. 18.: Quantitativer Immunadsorbenstest:

In Richtung x-Achse wurden die gesamt eingesetzten Mengen IgM, bezogen auf das Volumen des Immunadsorbens aufgetragen.
In Richtung y-Achse wurden die entsprechenden Anteile an nicht gebundenem (o) und mit Natronlauge desorbiertem IgM (●) aufgetragen.
Die gestrichelte Linie zeigt die zu erwartende Gesamtbilanz an.

Insert: Halblogarithmische Darstellung des Immunadsorbenstests.
Die x-Achse entspricht wieder der Menge eingesetzten IgM, bezogen auf das Volumen des Immunadsorbens.

C-2.4 Charakterisierung des isolierten IgM:

Das aus dem Serum MOPC 104E Tumor-tragender Mäuse isolierte Immunglobulin wurde mittels Gelchromatographie, Sedimentation in der Ultrazentrifuge sowie elektrophoretischer und immunologischer Methoden untersucht.

Gelchromatographie:

Bei Chromatographie an einer Sepharose-6B-Säule, die zuvor mit authentischen Proteinen (u.a. mit Kaninchen-IgM und Human-IgG) kalibriert wurde, stimmte das Elutionsvolumen für das isolierte Immunglobulin genau mit dem von Kaninchen-IgM überein. Außerdem war die Form des einzigen Peaks in der Transmission (280 nm) symmetrisch, so daß auf eine einheitliche Fraktion geschlossen werden konnte.

Sedimentationsverhalten:

Das isolierte Immunglobulin sedimentierte in der analytischen Ultrazentrifuge monodispers als einheitliche Substanz. Schneller sedimentierende Aggregate oder andere Verunreinigungen waren nicht nachzuweisen.

Die Sedimentationskoeffizienten unter Standardbedingungen $s_{20,w}$ wurden gemäß Chervenka (1973) aus den für fünf verschiedenen Proteinkonzentrationen erhaltenen Sedimentationskoeffizienten s_{obs} berechnet.

Tabelle 3: Sedimentationskoeffizienten von MOPC 104E IgM

c (mg/ml)	s_{obs} ($\times 10^{13}$ sec)	$s_{20,w}$ ($\times 10^{13}$ sec)
0,41	18,27	19,07
0,83	18,45	19,26
1,24	18,28	19,08
2,07	18,14	18,93
4,14	17,47	18,23

Die für die Umrechnung benötigten Größen wurden entweder experimentell ermittelt oder Tabellenwerken entnommen. Extrapolation der gefundenen Sedimentationskoeffizienten mittels linearer Regression auf die Konzentration "Null" liefert die Sedimentationskonstante $s_{20,w}^{\circ} = 19,36 \times 10^{-13}$ sec für MOPC 104E IgM (s. Abb. 19).

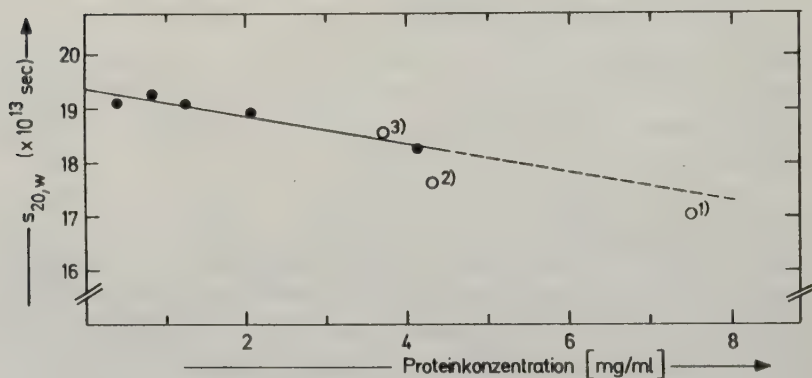


Abb. 19 : Ermittlung der Sedimentationskonstante $s_{20,w}^{\circ}$ für MOPC 104E IgM
Messwerte, die der Literatur entnommen wurden, sind durch offene Kreise eingezeichnet: 1) McIntire et al., 1965; 2) Young et al., 1971; 3) Hiramoto et al., 1972.

In dieser Abbildung sind zum Vergleich die bisher in der Literatur angegebenen Sedimentationskoeffizienten von MOPC 104E mit eingezeichnet. Diese Werte wurden allerdings jeweils nur für eine bestimmte Konzentration c bestimmt und nicht auf $c = 0$ extrapoliert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE):

In der Mikrodisk-PAGE nach Rüchel et al. (1973) wanderte das isolierte Immunglobulin als eine einheitliche Bande in das weniger stark vernetzte Ende des 1,2 - 30 %igen Gradientengels. Diese Methode, für die man äußerst geringe Proteinmengen benötigt, eignet sich wegen der einerseits einfachen Handhabung, andererseits wegen der sehr hohen Empfindlichkeit besonders zur schnellen Überprüfung der Reinheit und Intaktheit des nativen IgM.

In der Flachbett-SDS-PAGE nach Lämmli (1970) (s. B-3.2.1, S.34) drang das isolierte, nichtreduzierte IgM nicht in ein 5 %iges Gel ein. Das mit 2-Mercaptoäthanol reduzierte Immunglobulin wanderte in zwei Banden: einer der μ -Kette zuzuordnenden (MW $\approx$ 70 000) und einer Bande, die ein MW von 22 500 (L-Kette) aufweist.

Immunelektrophorese:

Mittels Immunelektrophorese (nach Hirschfeld, 1960) ließ sich eindeutig zeigen, daß es sich bei dem aus MOPC 104E Serum isolierten Immunglobulin ausschließlich um das im Serum vorhandene Myelomprotein handelt (Abb. 16, 2).

Hapten-Bindungstest:

Erste Bindungsexperimente mit radiojodiertem N4-HPPA im Farr-Test sowie in der Gleichgewichtsdialyse (s. B-3.2.2, S.36) bestätigten die immunologische Spezifität des isolierten Immunglobulins für Haptene der α -(1-3)-Glucan-Reihe.

Thermische Beständigkeit von MOPC 104E IgM:

Durch mehrstündiges Inkubieren von MOPC 104E IgM-Lösungen bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen und nachfolgendem quantitativen Immunadsorbenstest bei Raumtemperatur wurde geprüft, bis zu welcher Temperatur das Immunglobulin längere Zeit aufgeheizt werden kann, ohne daß sich die Bindungseigenschaften des IgM dem Immunadsorbens gegenüber irreversibel ändern.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen (33 μg IgM/25 μl Immunadsorbens) sollten gemäß den Ergebnissen des quantitativen Immunadsorbens-Tests (s. Insert in Abb. 18) 78 % des Immunglobulins adsorbiert werden. Wie sich zeigte, wurde das Bindevermögen von MOPC 104E IgM an das Immunadsorbens durch achtstündiges Inkubieren bei Temperaturen bis zu 50°C nicht beeinflußt und betrug ca. 80 % (Abb. 20).

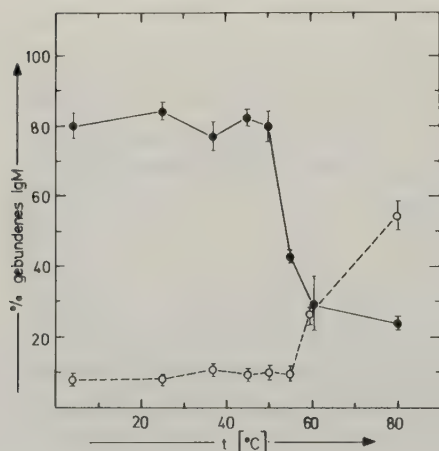


Abb. 20 : Thermische Beständigkeit von MOPC 104E IgM

Die Messwerte (Mittelwert und Standardabweichung aus drei Einzelbestimmungen) wurden aus dem quantitativen Immunadsorbens-Test ermittelt.

- (o) : IgM im Überstand
- (●) : an Adsorbens gebundenes und mit NaOH desorbiertes IgM

Durch Inkubation bei höheren Temperaturen wird das IgM irreversibel verändert. Dies zeigt sich in dem signifikant herabgesetzten Bindevermögen des IgM in den entsprechenden Proben.

Für die Untersuchung zur Temperaturabhängigkeit von MOPC 104E IgM (s. Abschnitt C-4, S.129) bedeutete dieses Ergebnis, daß die vorgesehenen Experimente innerhalb des Temperaturbereiches von 4°C bis höchstens 50°C durchgeführt werden mußten.

Zusammenfassende Übersicht:

Die Identität des isolierten Serumproteins mit MOPC 104E IgM zeigte sich insbesondere in der Immunelektrophorese und den Hapten-Bindungstests. Elektrophoretisch und chromatographisch waren in dem isolierten Protein keine anderen Serumproteine oder Kontaminationen nachweisbar. Das monodisperse Sedimentationsverhalten mit $s_{20,s}^{\circ} = 19,36 \times 10^{-13}$ sec in der analytischen Ultrazentrifugation wies ebenfalls auf ein einheitliches Immunglobulin der IgM-Klasse hin. Der Extinktionskoeffizient, bestimmt durch Trockengewichtsbestimmung mit der Cahn-Waage (Kickhöfen und Warth, 1976) und UV-Spektrum, betrug in Übereinstimmung mit dem Literaturwert (Leon et al., 1970) für eine 1 %ige Lösung bei 280 nm $16,0 \text{ cm}^{-1}$. Als Molekulargewicht wurde ein Wert von 900 000 angenommen.

C-2.5 Hinweise zum Umgang mit MOPC 104E IgM in Lösung:

Isoliertes MOPC 104E IgM ist mehrere Monate bei +4°C haltbar, wenn es in dem bei der Elution von der Adsorbenssäule entstehenden Puffergemisch (Gly/HCl + BSB, pH 7,0 - 7,5) aufbewahrt wird. Einfrieren der Proteinlösung, wie dies bei vielen anderen Immunglobulinen üblich ist, kann nicht empfohlen werden, da unter diesen Bedingungen ein Teil des IgM unlösliche Aggregate bildet. Aggregation und Präzipitation von MOPC 104E IgM wurden ebenfalls beobachtet, wenn die Proteinlösung Kontakt mit verschiedenen Kunststoffen, insbesondere mit Teflon (Wechselwirkung mit der stark hydrophoben Oberfläche?), hatte. Aus diesem Grund wurde darauf geachtet, MOPC 104E IgM-Lösungen möglichst nur in Glasgefäßen aufzubewahren und Kontakt mit Teflon zu vermeiden.

C-3 Untersuchung des Hapten-Antikörper-Komplexes:

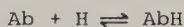
C-3.1 Statische Untersuchungen:

C-3.1.1 Gleichgewichtsmessungen:

Zur Methode der Gleichgewichtsmessungen allgemein:

Alle Änderungen, die auf Grund von Protein-Ligand-Wechselwirkungen an einem von beiden Partnern auftreten und in Form von messbaren Parametern erfaßt werden können, lassen sich prinzipiell immer dann zur Beschreibung von Assoziationsgleichgewichten und zur Berechnung der sie bestimmenden thermodynamischen Größen heranziehen, wenn die Änderung des Parameters proportional zur Konzentrationsänderung des Protein-Ligand-Komplexes verläuft.

Allen diesen Verfahren zur Bestimmung von Bindungsgleichgewichten ist das Ermitteln der Konzentration des gebildeten Komplexes $[AbH]$ in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration von Ligand $[H_t]$ und Protein $[Ab_t]$ gemeinsam. Der Auswertung liegt das Massenwirkungsgesetz zugrunde, das für die Reaktion



eines monovalenten Proteins mit einem monovalenten Liganden wie folgt formuliert werden kann

$$K = \frac{[AbH]}{([H_t] - [AbH]) \cdot ([Ab_t] - [AbH])} .$$

Wie Scatchard (1949) und Klotz (1953) zeigen konnten, gilt für n-valente Proteine, sofern die Bindungsstellen am Protein unabhängig voneinander reagieren, mit $[H_t] - [AbH] = c$ und

$$[AbH]/[Ab_t] = r$$

$$r/c = nK - rK .$$

Dementsprechend liefert - bei homogenen Antikörpern und dem Fehlen von negativer oder positiver Kooperativität - Auftragung von r/c versus r ("Scatchard-Plot") eine Gerade mit der Steigung - K und dem Abszissen-Schnittpunkt n .

Zur Behandlung von Gleichgewichten beim Vorliegen heterogener Antikörper dient häufig die Sips-Funktion (Sips, 1949; Nisonoff u. Pressman, 1958 a,b)

$$\frac{n}{r} = \frac{(K_0 \cdot c)^\alpha}{1 + (K_0 \cdot c)^\alpha}$$

Sie enthält den Heterogenitätsindex α ($0 \leq \alpha \leq 1$), dessen Abweichung von 1 ein Maß für die Streuung der freien Bindungsenergien um einen Mittelwert darstellt (die Sips-Verteilung ist mit der Gauß'schen Normalverteilung annähernd identisch, besitzt jedoch mathematisch den Vorteil der analytischen Integrierbarkeit).

Logarithmische Umformung führt zu

$$\log \frac{r}{n-r} = \alpha \log c + \alpha \log K_0$$

Unter der Voraussetzung von Sips-, d.h. praktisch normal-verteilten Bindungsaffinitäten ergibt das Auftragen von $\log [r/(n-r)]$ vs. $\log c$ ("Sips-Plot") eine Gerade mit der Steigung α .

Aus dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse (hier ist $\log [r/(n-r)] = 0$, das bedeutet Halbsättigung des Proteins, mit $r = n/2$) berechnet sich die sogenannte "average intrinsic association constant" $K_0 = 1/c$.

Für homogene Antikörper, wie z.B. den monoclonalen Myelomproteinen, vereinfacht sich die Sips-Gleichung, da in diesem Fall der Heterogenitätsindex α gleich 1 ist. Bei bekannter Valenz der Antikörper wird anstelle der Antikörperkonzentration $[Ab_t]$ oftmals (unter Verwendung des gleichen Symbols) die Konzentration an Bindungsstellen ($n = 1$) für die Berechnung der Gleichgewichte eingesetzt. Auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien wurde diese "normale" Antikörperkonzentration verwendet.

Aus der Assoziationskonstante K läßt sich die treibende Kraft der Reaktion, die Gibbs'sche freie Energie, ΔG nach

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (R = 1,98 \times 10^{-3} \text{ kcal} \cdot \text{Grad}^{-1} \cdot \text{l}^{-1})$$

$$(T[^\circ\text{K}] = T[^\circ\text{C}] + 273)$$

berechnen. Für den Vergleich der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Ligand ist diese thermodynamische Größe sowie die sie bestimmenden Enthalpie- und Entropiebeiträge ΔH und ΔS besonders wichtig. Die beiden letzteren sind aus der Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten nach der Van't Hoff-Gleichung

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

sowie der Gibbs-Helmholtz-Beziehung

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

bestimmt. Die Bindungsenthalpie ΔH kann auch direkt durch isotherme Reaktionskalorimetrie gemessen werden.

Für den Vergleich von Entropieänderungen werden zweckmäßigerweise die Anteile der Mischungsentropie nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wird die Entropieänderung in Form der unitären Größe

$$\Delta S_u = \Delta S + 7,98 \text{ eu (für wässrige Lösungen)}$$

angegeben (Kauzmann, 1959).

Zur Gleichgewichtsdialyse:

Die Gleichgewichtsdialyse ist das klassische und auch heute noch vielbenutzte Verfahren zur Bestimmung von Bindungsgleichgewichten zwischen hochmolekularem Protein und niedermolekularem Ligand. Bei ihr werden Protein- und Haptenlösung in zwei durch eine nur für das Hapten durchlässige Dialysemembran getrennte Halbzellen gefüllt und nach Einstellen des Gleichgewichtes die Konzentrationen an Hapten in beiden Halbzellen bestimmt. In der Halbzelle, in der sich auch die Antikörper befinden, liegt die Konzentration $[H_t] = [AbH] + [H]$ vor, während in der anderen Halbzelle die Haptenkonzentration $[H]$ beträgt ($[H]$ und $[AbH]$ sind die Konzentrationen an freiem und gebundenem Hapten). Mit diesen Werten und dem oben beschriebenen Formalismus lassen sich aus

Sips- und Scatchard-Plot die Assoziationskonstante K_0 , die Valenz des Antikörpers n sowie der Sips'sche Heterogenitätsindex α bestimmen.

Zur Verdrängungs-Gleichgewichtsdialyse:

Wird bei der Gleichgewichtsdialyse das markierte Hapten H_1 mit einem nicht-markierten Hapten H_2 verschnitten, so läßt sich die Assoziationskonstante K_2 für den Inhibitor aus der bekannten Assoziationskonstanten K_1 für das markierte Hapten, der Proteinkonzentration $[Ab_t]$, den Gesamtkonzentrationen an markiertem und nicht-markiertem Hapten $[H_{t,1}]$ und $[H_{t,2}]$, der Valenz der Antikörper n sowie der direkt meßbaren Konzentration des markierten, gebundenen Haptens $[AbH_1]$ mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes bestimmen (Licht et al., 1977; Lancet, 1978):

$$K_1 = \frac{[AbH_1]}{(n[Ab_t] - [AbH_1] - [AbH_2]) \cdot ([H_{t,1}] - [AbH_1])}$$

$$K_2 = \frac{[AbH_2]}{(n[Ab_t] - [AbH_1] - [AbH_2]) \cdot ([H_{t,2}] - [AbH_2])}$$

In der ersten Gleichung sind alle Größen außer $[AbH_2]$ bekannt oder meßbar, so daß diese wie folgt berechnet werden kann:

$$[AbH_2] = n[Ab_t] - [AbH_1] \cdot \left(1 + \frac{1}{K_1 \cdot ([H_{t,1}] - [AbH_1])}\right)$$

Durch Einsetzen in die zweite Gleichung erhält man sofort die Assoziationskonstante für den Inhibitor, K_2 .

Zur fluorimetrischen Titration:

Für die Bestimmung von Bindungsgleichgewichten eignen sich auch optische Parameter, die Änderungen in der Antikörper-Hapten-Komplex-Konzentration $[AbH]$ nahezu trägheitslos anzeigen. Damit ist außerdem die Möglichkeit gegeben, die sehr schnell verlaufende Komplexbildung kinetisch zu verfolgen (vgl. C-3.2.1, S.114).

Bei Anwendung von fluoreszenzoptischen Methoden, die sich durch sehr hohe Empfindlichkeit auszeichnen, benötigt man stark verdünnte Proteinlösung (ca. 50 - 100 µg/ml maximal). Hierdurch ist die Anwendung dieser Methoden sehr materialsparend. Außerdem werden Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen, wie sie bei konzentrierten Lösungen auftreten können und sich z.B. durch Aggregation bemerkbar machen, weitgehend unterbunden.

Am meisten verwendet wird die Methode der fluorimetrischen Titration. Hierbei wird entweder Protein- oder Haptenslösung vorgelegt und mit einer Lösung des entsprechenden anderen Reaktionspartners titriert. Bei Anregung im Excitationsmaximum λ_{Ex} wird während der Titration die Verstärkung (Enhancement) oder die Verringerung (Quench) der Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum λ_{Em} von Protein oder Hapten gemessen. Man unterscheidet drei Fälle:

Anregend bei λ_{Ex} von	Beobachtung bei λ_{Em} von	Notwendige optische Eigenschaft des Haptens	Mögliche Art der Fluoreszenzänderung
1: Protein	Protein	keine	Quench oder Enhancement der Proteinfluoreszenz
2: Hapten	Hapten	("induzierbare") Fluoreszenz	Quench oder Enhancement der Haptenfluoreszenz
3: Protein	Hapten	("induzierbare") Fluoreszenz mit λ_{Em} (Protein) = λ_{Ex} (Hapten)	Quench der Protein- und Enhancement der Haptenfluoreszenz

Zu 1) Immunglobuline zeigen insbesondere auf Grund der in ihnen vorhandenen Tryptophangruppen eine "intrinsic" Fluoreszenz mit $\lambda_{Ex} = 280$ nm und $\lambda_{Em} = 340$ nm. Da die Quantenausbeute und damit die Intensität der Fluoreszenz in weitem Maße von der direkten Umgebung des Fluorophors abhängen, kann Bindung von Hapten an ein Immunglobulin die Fluoreszenz von Tryptophangruppen in oder nahe der Bindungsstelle beeinflusst werden.

sen, ohne daß hierzu bestimmte optische Eigenschaften des Haptens unbedingt erforderlich sind (Jolley und Glaudemans, 1974; Blatt, 1976). Die Änderung der "intrinsic" Proteinfluoreszenz stellt ein Maß für die Bindung von Hapten an den Antikörper dar.

- Zu 2) Damit Änderungen in der Haptenfluoreszenz beobachtet werden können, muß entweder die determinante Gruppe selbst fluoreszieren, oder mit einem Fluoreszenz-Marker versehen sein. Besonders zu erwähnen sind bestimmte Acridin- und Naphtyl-sulfonsäure-Abkömmlinge, wie z.B. MANS (N-Methyl-2-anilinonaphthyl-6-sulfonsäure), ANS (1-Anilinonaphthyl-8-sulfonsäure) und 5-(4'-Carboxyanilino)-2-chloro-7-methoxyacridin (Weber und Laurence, 1954; Onodera et al., 1976), die in polarem (z.B. wässrigem) Medium nahezu nicht, in apolarer Umgebung jedoch sehr stark fluoreszieren ("induzierbare" Fluoreszenz). Haptene, die solche Molekülstrukturen aufweisen, zeichnen sich oft auch bei Bindung an ein Immunglobulin durch Enhancement der Haptenfluoreszenz aus.
- Zu 3) Eine Übertragung der durch Absorption aufgenommenen Energie von den Tryptophangruppen des Proteins auf die Fluorophore des Haptens kann auf verschiedene Arten zustande kommen: durch Absorption des von den Tryptophangruppen emittierten Lichtes durch das Hapten und erneute Emission bei einer größeren Wellenlänge oder strahlungslos auf Grund von Resonanz zwischen den Fluorophoren im angeregten und Grundzustand (Förster, 1960 a,b). In beiden Fällen ist eine Überlappung des Emissionsbereiches des Donator (Tryptophan) mit dem Excitationsbereich des Akzeptors (Hapten) Voraussetzung.

Die Valenz des Antikörpers kann nur mit den Methoden 2 und 3, in denen Änderungen der Haptenfluoreszenz gemessen werden, aus dem Scatchard-Plot direkt bestimmt werden. Bei Methode 1 muß die Valenz bekannt sein, da sie für die Auswertung der Fluoreszenzänderungen direkt benötigt wird.

Da in der vorliegenden Arbeit nur fluorimetrische Titrations vom Typ 1 durchgeführt wurden, soll im folgenden auch nur die Auswertung nach dieser Methode besprochen werden.

Zur Auswertung des Quenches der "intrinsic" Proteinfluoreszenz für Gleichgewichtsmessungen:

Wird die Intensität der Tryptophanfluoreszenz der Immunglobuline infolge von Haptenbindung verringert, so spricht man von Fluoreszenzlöschung oder Quench. Der Betrag des Quenches (ausgedrückt

in % der Anfangsfluoreszenz) ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig und kann generell nicht im voraus bestimmt werden. Unter der Annahme, daß jegliche Fluoreszenzminderung auf Haptenbindung zurückgeführt werden muß (spezifischer Quench), strebt der Quench Q einem Grenzwert $Q_{\max}$ zu, der dann erreicht ist, wenn alle Bindungsstellen des Proteins mit Hapten besetzt sind. Für Immunglobuline, bei denen keine Beeinflussung der Assoziationskonstanten durch bereits ausgebildete Hapten-Antikörper-Komplexe stattfindet (negative oder positive Kooperativität), läßt sich das Annähern an den Grenzwert $Q_{\max}$ mit steigender Haptenkonzentration $[H_t]$ mathematisch und graphisch in Form einer hyperbolischen Sättigungskurve beschreiben:

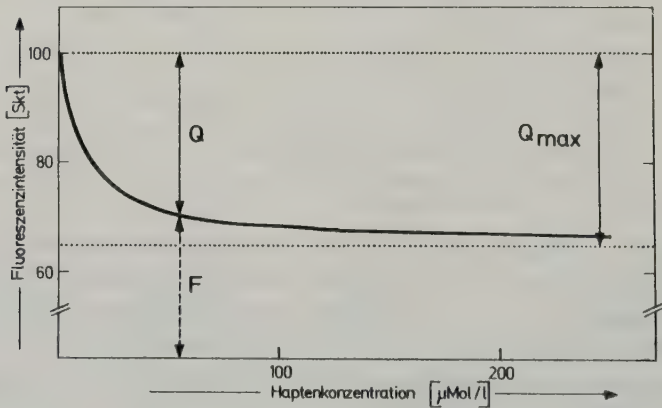


Abb. 21 : Typisches Bild einer Sättigungskurve bei der fluorimetrischen Titration

Aus dem bei einer bestimmten Hapten-Gesamtkonzentration $[H_t]$ gemessenen Fluoreszenzquench Q läßt sich direkt bestimmen, welcher Bruchteil r der Gesamtkonzentration der Bindungsstellen $[Ab_t]$ des Proteins mit Hapten besetzt sind. Die Konzentration an besetzten Bindungsstellen ist durch $[AbH]$ ausgedrückt:

$$r = \frac{Q}{Q_{\max}} = \frac{[AbH]}{[Ab_t]} .$$

Die Konzentration von nicht-gebundenem Hapten $[H] \equiv c$ berechnet sich nach:

$$c = [H_t] - [AbH] .$$

Aus der Sättigungskurve einer fluorimetrischen Titration erhält man auf diese Art sofort den Scatchard-Plot r/c versus r sowie für $n = 1$ den Sips-Plot $\log r/(1-r)$ versus $\log c$ (s. o.).

Auswertung in der Praxis:

Bevor man die eigentliche Sättigungskurve des Fluoreszenzquenches in der Praxis erhält, müssen in der Regel zunächst einige Korrekturen vorgenommen werden:

1) Volumenkorrektur:

Da die "intrinsic" Fluoreszenz sehr verdünnter Proteidlösungen (0.D. $280 \text{ nm} < 0,1$) direkt proportional der Proteinkonzentration ist, kann der nach Zugabe eines bestimmten Volumens V_{add} gemessene Fluoreszenzwert F_{obs} sofort auf den volumenkorrigierten Wert F_{VK} (bezogen auf das Anfangsvolumen V_0) umgerechnet werden:

$$F_{\text{VK}} = F_{\text{obs}} \cdot \frac{V_0 + V_{\text{add}}}{V_0}$$

2) Korrektur für nicht-spezifischen Quench:

Oftmals wird auf Haptenzugabe ein Quench der Tryptophanfluoreszenz in Immunglobulinen beobachtet, die keine Spezifität für dieses Hapten haben. Dieses Phänomen, das unterschiedlichste Ursachen haben kann, z.B. die Erhöhung des "inner-filter"-Effektes infolge Eigenabsorption des Haptens bei 280 nm oder die Absorption des emittierten Lichtes, bewirkt den nicht-spezifischen Quench.

Die Korrektur hierfür wird ausgeführt, indem nacheinander hapten-spezifische und hapten-unspezifische Immunglobulinlösungen von identischer optischer Dichte bei 280 nm und gleichem Anfangsvolumen unter denselben apparativen Bedingungen mit derselben Haptenlösung titriert werden. Beide Titrationen werden zunächst volumenkorrigiert und auf den gleichen Anfangsfluoreszenzwert 100 normiert. Aus diesen beiden Titrationskurven berechnet sich die Sättigungskurve für den spezifischen Quench Q gemäß

$$F_{\text{sp}} = 100 \cdot \frac{F_{\text{VK,tot}}}{F_{\text{VK,nsp}}} \quad \text{und} \quad Q = 100 - F_{\text{sp}} \quad (\text{vgl. Abb. 22}).$$

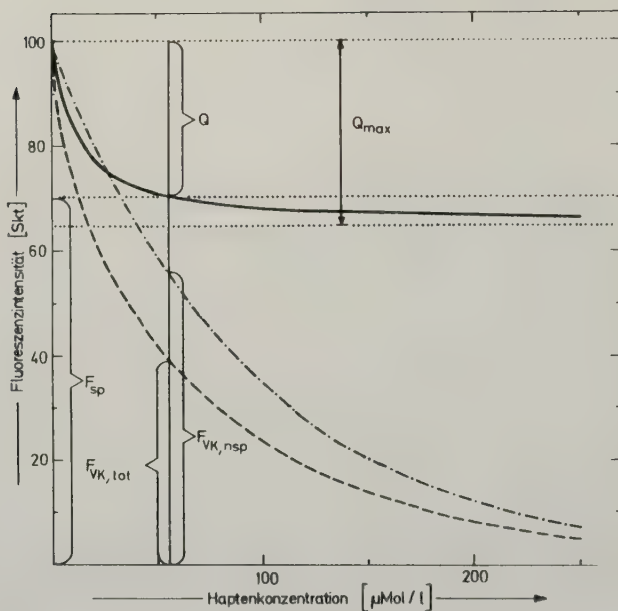


Abb. 22: Schematische Skizze zur Auswertung fluorimetrischer Titrationen
 Volumenkorrigierte Titrationskurven mit den entsprechenden Fluoreszenzintensitäten des haptenspezifischen (--- $F_{VK,tot}$)
 und haptens-unspezifischen Immunglobulins (--- $F_{VK,nsp}$),
 sowie die daraus resultierende Sättigungskurve für den spezifischen Quench Q (—, F_{sp}). Der Grenzwert des Quenches ist mit Q_{max} bezeichnet.

Weitere Schwierigkeiten in der Auswertung von fluorimetrischen Titrationen ergeben sich, wenn es nicht möglich ist, den Maximalquench Q_{max} experimentell zu ermitteln. Insbesondere tritt diese Schwierigkeit bei Hapten-Antikörper-Komplexen mit kleinen Assoziationskonstanten auf, wenn z.B. die Löslichkeit des Haptens nicht ausreicht, um eine Haptenkonzentration zu erreichen, bei der alle Bindungsstellen des Immunglobulins besetzt werden können. Schwierig-

keiten treten auch dann auf, wenn der nicht-spezifische Quench zu einer so starken Abnahme der Proteinfluoreszenz führt, daß die Ermittlung der spezifischen Fluoreszenz im Bereich hoher Haptenkonzentrationen auf Grund von Meßungenauigkeiten zu fehlerhaft wird. Dieses letztere trifft für die im Rahmen dieser Arbeit ausgeführten fluorimetrischen Titrationen zu.

Aus den experimentellen Werten kann der maximale Quench $Q_{\max}$ mathematisch ermittelt werden:

- a) $Q_{\max}$ ist ein Grenzwert, der bei unendlich hoher Haptenkonzentration erreicht wird:

$$\lim_{[H_t] \rightarrow \infty} Q = Q_{\max}.$$

Somit läßt sich $Q_{\max}$ aus einem Plot $Q/[H_t]$ versus Q durch Extrapolation für $Q/[H_t]$ gegen 0 ermitteln (Glaudemans et al., 1977). Da bei der fluorimetrischen Titration die Konzentration der Bindungsstellen $[Ab_t]$ normalerweise sehr klein ist, kann in einem weiten Bereich der Titration die Konzentration an nicht-gebundenem der an gesamtem Hapten gleichgesetzt werden:

$$c \approx [H] = [H_t] \quad \text{für } [H_t] \gg [Ab_t].$$

Gilt diese Voraussetzung, so ist der oben genannte Plot identisch mit dem Scatchard-Plot:

$$r/c = nK - K \cdot r.$$

Für $r = Q/Q_{\max}$ gilt: $Q/(c \cdot Q_{\max}) = nK - KQ/Q_{\max}$

$$Q/c = nKQ_{\max} - KQ.$$

Für $[Ab_t] = \text{"normale" Konzentration des Antikörpers (n = 1)}$ vereinfacht sich die Gleichung auf: $Q/c = K \cdot Q_{\max} - K \cdot Q$. In einem linearen Plot ist das Gefälle gleich der Bindungskonstanten.

- b) Allgemein kann die Sättigungskurve in der fluorimetrischen Titration als eine Funktion der Konzentrationen des Haptens $[H_t]$ und der Antikörper $[Ab_t]$, deren Valenz n , des Heterogenitätsindex α , des maximal möglichen Fluoreszenzquenches $Q_{\max}$ sowie der Assoziationskonstante K dargestellt werden:

$$F_{sp} = f([H_t], [Ab_t], n, \alpha, Q_{\max}, K)$$

Bei Vorgabe der experimentell erhaltenen Werte F_{sp} für die jeweiligen Konzentrationen $[H_t]$ und $[Ab_t]$ können mit Hilfe eines Minimalisierungs-Programms, dem der Powell-Algorithmus (Powell, 1971) zugrunde liegt, die best-passenden Werte für die Parameter $n, \alpha, Q_{\max}$ und K ermittelt werden (Lancet, 1978). Als Kriterium für die Güte der kalkulierten Parameter gilt die Übereinstimmung der experimentellen ($F_{sp,e}$) mit den theoretisch berechneten Werten ($F_{sp,th}$) der spezifischen Fluoreszenz, wie sie sich durch die Fehlerquadratsumme

$$S_F = \sum (F_{sp,e} - F_{sp,th})^2$$

ausdrückt.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle fluorimetrischen Titrationen auf einer IBM-370/165 Großrechenanlage mit Hilfe von Computerprogrammen, die D. Lancet geschrieben hat (Lancet, 1978), ausgewertet:

Zunächst wurden mittels des Programms FQ die experimentellen Daten der nicht-spezifischen und der totalen Fluoreszenztitration (F_{nsp} und F_{tot}) normiert und volumenkorrigiert und aus ihnen die Punkte der spezifischen Sättigungskurve F_{sp} ermittelt. Ausgehend von der Annahme, daß alle Bindungsstellen von MOPC 104E IgM homogen und frei verfügbar sind ($n, \alpha = 1 = \text{konstant}$), wurde aus den Daten der Sättigungskurve mit Hilfe des Minimalisierungs-Programms TT1 der maximale Quench $Q_{\max}$ sowie die Assoziationskonstante K ermittelt. Aus den Werten des spezifischen Quenches und dem mit TT1 ermittelten $Q_{\max}$ berechnet FQ den Sips- und Scatchard-Plot und zeichnet beide. Ein typisches Beispiel für den graphischen "output" der Programme ist in Abb. 23 gezeigt.

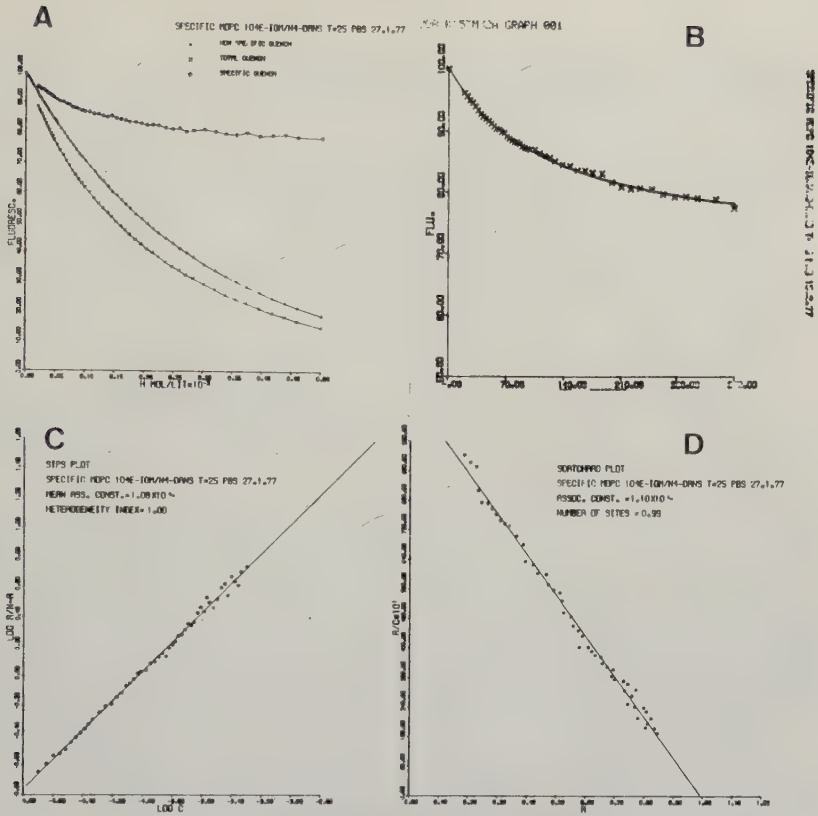


Abb. 23 : Beispiel für den graphischen "output" der Computerprogramme FQ und TT1 zur Auswertung der fluorimetrischen Titration:

Experiment: Fluorimetrische Titration von MOPC 104E IgM mit N4-Dns bei 25°C. Die Proteinkonzentration im Anfangsvolumen (1000 µl) war $2,14 \times 10^{-6}$ n. Titriert wurde mit einer $3,88 \times 10^{-3}$ m N4-Dns-Lösung in PBS.

- Volumenkorrigierte Titrationskurven von MOPC 104E IgM-Lösung ("TOTAL QUENCH" x-x-x-) und ByG-Lösung ("NON SPECIFIC QUENCH" Δ-Δ-Δ), sowie die aus beiden Kurven berechnete Sättigungskurve ("SPECIFIC QUENCH", □-□-□). (Aus Programm FQ)
- Aus den Punkten der Sättigungskurve (x) wurde mit Hilfe des Minimalisierungs-Programms TT1 die Bindungskonstante ($K = 1,08 \cdot 10^4 \text{ m}^{-1}$) sowie der Quench bei Sättigung aller Bindungsstellen ($Q_{\text{max}} = 25,04 \%$) ermittelt. Die durchgezogene Linie stellt die aus den vorgegebenen und berechneten Parametern kalkulierte theoretische Sättigungskurve dar. (Aus Programm TT1)
- Sips- und
- Scatchard-Plot, jeweils aus den experimentellen Daten der Sättigungskurve sowie dem mit TT1 ermittelten Q_{max} berechnet. Die durchgezogenen Linien stellen die Geraden der linearen Regression dar. (Aus Programm FQ)

Ergebnisse aus Gleichgewichtsdialysen:

Gleichgewichtsdialysen (vgl. B-4.1.1, S.37) von MOPC 104E IgM mit tritium-markierten Haptenen (N3-³H-Alditol und N4A-³H-Alditol) wurden bei 4°C sowie zusätzlich mit N4A-CH₂OH bei 24°C durchgeführt. Obwohl für Gleichgewichtsdialysen bei 24°C die Immunglobulinlösung durch einen zusätzlichen Gehalt an Gelatine (0,05 %) stabilisiert wurde, konnte nicht verhindert werden, daß nach 24stündigem Inkubieren der Proteinlösung in den Lucite-Zellen das Immunglobulin auszufallen begann. In Vergleichslösungen, die während der gleichen Zeit und ebenfalls bei 24°C in Glasröhrchen aufgehoben wurden, war keinerlei Anzeichen einer beginnenden Aggregation feststellbar. Die Bindungskonstanten K wurden aus dem Sips- und Scatchard-Plot ermittelt (Abb.24, Tab. 4).

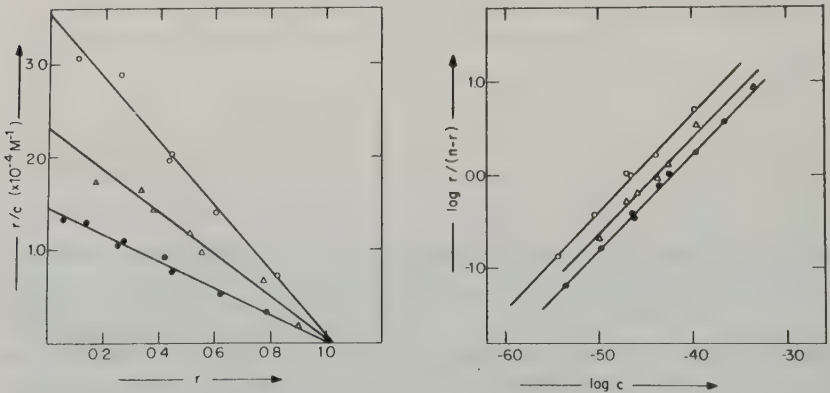


Abb. 24 : Scatchard- und Sips-Plot von MOPC 104E IgM und tritium-markierten Haptenen

Kreise: Gleichgewichtsdialysen mit N4A-CH₂OH

Dreiecke: Gleichgewichtsdialysen mit N3-CH₂OH

Gleichgewichtsdialysen bei 4°C sind durch offene, bei 24°C durch ausgefüllte Symbole gekennzeichnet. Die eingezeichneten Geraden wurden durch lineare Regression ermittelt.

Tabelle 4: Aus Gleichgewichtsdialysen ermittelte Bindungsparameter für MOPC 104E IgM

Hapten	T(°C)	K ($\times 10^{-4} \text{ m}^{-1}$) aus		α	n
		Sips-Plot	Scatchard-Plot		
N3-CH ₂ OH	4	2,4	2,3	0,98	1,02
N4A-CH ₂ OH	4	3,7	3,5	1,03	1,02
N4A-CH ₂ OH	24	1,5	1,4	1,00	1,01

Die lineare Anordnung der Meßpunkte in den Plots sowie die gefundenen Werte für den Heterogenitätsindex α und die Valenz n einer Bindungsstelle (als Konzentration der Proteinlösung wurde ihre Normalität in die Berechnung eingesetzt) sind eindeutige Indizien für die Homogenität der pro Antikörpermolekül zur Verfügung stehenden 10 Bindungsstellen. Aus den ermittelten Assoziationskonstanten für N4A-CH₂OH bei 4°C und 24°C lassen sich die thermodynamischen Parameter $\Delta H = -7,4 \text{ kcal/Mol}$ und $\Delta S_u = +2,0 \text{ eu}$ berechnen.

Ergebnisse der Verdrängungs-Gleichgewichtsdialyse:

Mittels der Verdrängungs-Gleichgewichtsdialyse (B-4.1.1, S.38) bei 4°C wurden die Bindungskonstanten verschiedener, nicht markierter Haptene bestimmt, die mit N4A-³H-Alditol um die Bindungsstellen in MOPC 104E IgM konkurrierten. Die gefundenen Assoziationskonstanten stimmen recht gut mit denjenigen überein, die Young et al. (1971) mittels Präzipitationshemmversuchen für gleiche Haptene ermittelt hatte, wenngleich auch auffällt, daß unsere Werte alle höher sind als die in der Literatur beschriebenen (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Aus Verdrängungs-Gleichgewichtsdialysen ermittelte Bindungskonstanten für MOPC 104E IgM:

Hapten	K (x 10^{-4}m^{-1})	
N3-CHO	4,2	(2,9) ^{a)}
N4-CHO	3,5	(3,1) ^{a)}
N5-CHO	4,0	-
N3-CH ₂ OH	2,4	(1,8) ^{a)}
N4A-CHO	4,6	(3,4) ^{a)}
N4A-CH ₂ OH	3,6	-

a) In Klammern: Literaturwerte aus Young et al., (1971).

Bei den Ergebnissen der Verdrängungsgleichgewichtsdialyse verdient die Tatsache, daß sowohl für N3-CH₂OH als auch für N4A-CH₂OH (Selbstverdrängung) die gleichen Bindungskonstanten wie bei der direkten Gleichgewichtsdialyse erhalten wurden, als interne Kontrolle eine besondere Beachtung.

Ergebnisse aus fluorimetrischen Titrationsen:

Die durchgeführten fluorimetrischen Titrationsen von MOPC 104E IgM (s. B-4.1.1, S.38) beruhten auf dem Quench der "intrinsic" Proteinfluoreszenz ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 340 \text{ nm}$), der die Sättigung der Bindungsstellen mit Hapten anzeigt. Wurde mit dem nicht-derivatisierten Hapten N4A-CHO nur ein maximaler Quench von $Q_{\text{max}} = 10 \%$ beobachtet (Blatt, 1976; Schepers et al., 1978), so bewirkte die Derivatisierung der Oligosaccharide zu ihren Dansylhydrazonen eine wesentliche Steigerung von Q_{max} , die sich in den entsprechenden Werten für N4A-Dns (35 %), N3-Dns (29 %), N4-Dns (25 %) und N5-Dns (23 %) ausdrückt. Die Bindungskonstanten von MOPC 104E IgM mit den dansylierten Oligosacchariden wurden durch

fluorimetrische Titration bei 4°C und 25°C bestimmt. Mit N3-Dns wurden zusätzlich die Assoziationskonstanten bei 16,5°C und 34,8°C ermittelt. Aus den Sättigungskurven der Titration wurden, unter der Voraussetzung, daß n und α konstant ($= 1,00$) sind, die Assoziationskonstante sowie der Wert für den Maximalquench ermittelt. Die Bindungskonstanten wurden anschließend durch Sips- und Scatchard-Plot bestätigt. Die Werte sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Aus fluorimetrischen Titrationen ermittelte Bindungsparameter für MOPC 104E IgM

K (x 10 ⁻⁴ m ⁻¹) bestimmt aus				α	n	K ^{a)}
Sättigungs- kurve	Sips-Plot	Scatchard- Plot		aus Sips- Plot	aus Scatchard- Plot	(x 10 ⁻⁴ m ⁻¹)
T = 4°C						
N3-Dns	2,64	2,62	2,62	1,01	1,00	2,63 ± 0,01
N4-Dns	2,19	2,18	2,19	1,01	1,00	2,19 ± 0,01
N5-Dns	3,95	4,04	3,85	0,97	1,01	3,95 ± 0,10
N4A-Dns	14,4	14,5	13,6	0,99	1,01	14,2 ± 0,5
T = 25°C						
N3-Dns	0,85	0,87	0,83	1,04	1,02	0,85 ± 0,02
N4-Dns	1,08	1,08	1,10	1,00	0,99	1,09 ± 0,01
N5-Dns	1,76	1,78	1,83	0,97	0,99	1,79 ± 0,04
N4A-Dns	7,00	6,92	7,02	1,02	1,00	6,98 ± 0,05
N3-Dns: t = 16,5°C K = 1,36 · 10 ⁴ m ⁻¹ (α,n = 1)						
t = 34,8°C K = 0,47 · 10 ⁴ m ⁻¹ (α,n = 1)						

Sips- und Scatchard-Plot sind bei der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Auswertung der fluorimetrischen Titrationen keine unabhängigen Bestimmungsmethoden für K , da für die Berechnung beider Plots der mittels des Minimalisierungsprogramms TT1 aus der Sät-

tigungskurve ermittelte Wert für $Q_{\max}$ (Voraussetzung war $\alpha, n = 1,00$) benutzt wurde. Beide Plots sind jedoch, neben der Übereinstimmung von experimenteller mit der theoretisch berechneten Sättigungskurve ein wertvolles Indiz für die Beurteilung der Ergebnisse: Die strenge Linearität beider Plots, die in allen durchgeführten Experimenten gefunden wurde (als Beispiel s. Abb. 25, sowie Abb. 23, S.95), die aus ihnen ermittelten Werte für α und n sowie die Übereinstimmung der Bindungskonstanten K bestätigen die aus den Sättigungskurven ermittelten Werte für K und $Q_{\max}$.

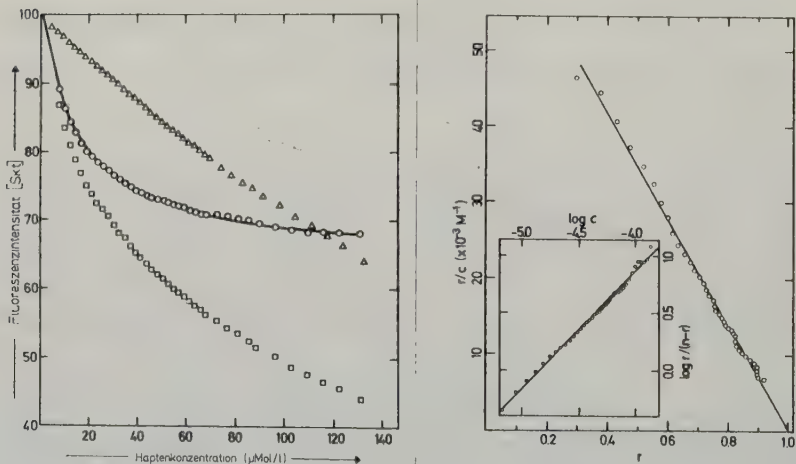


Abb. 25 : Fluorimetrische Titration von MOPC 104E IgM mit N4A-Dns bei 25°C

Die Proteinlösung war im Anfangsvolumen (1,000 ml) $2,12 \times 10^{-6}$ n. Titriert wurde mit 45 μ l einer $3,31 \times 10^{-3}$ m N4A-Dns-Lösung in PBS.

Links: Volumenkorrigierte Titrationskurve von ByG (Δ) und MOPC 104E IgM ($\circ$). Die Sättigungskurve für den spezifischen Quench ($\square$) wurde aus den beiden Titrationskurven berechnet. Die durchgezogene Linie stellt die aus den experimentellen Werten mit Hilfe des Computers berechnete theoretische Sättigungskurve dar.

Rechts: Scatchard- und Sips-Plot (Insert), die aus den experimentellen Daten und dem aus der Sättigungskurve bestimmten $Q_{\max} = 35,3\%$ berechnet wurden. Die durchgezogenen Geraden wurden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadratsumme ermittelt.

Aus den Assoziationskonstanten bei 4°C und 25°C ließen sich die thermodynamischen Größen ΔG , ΔH und ΔS_u berechnen (vgl. S.86):

Tabelle 7: Thermodynamische Parameter von MOPC 104E IgM mit dansylierten Oligosacchariden

Hapten	ΔG (4°C) [kcal/mol]	ΔG (25°C) [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	ΔS_u (4°C) [eu]	ΔS_u (25°C) [eu]
N3-Dns	-5,6	-5,4	-8,8	-3,7	-3,7
N4-Dns	-5,5	-5,5	-5,5	+8,2	+8,2
N5-Dns	-5,8	-5,8	-6,2	+6,7	+6,7
N4A-Dns	-6,5	-6,6	-5,6	+11,5	+11,5

Die für das Hapten N3-Dns gemessenen Bindungskonstanten liegen im Van't Hoff-Plot ($\ln K$ versus $1/T$) auf einer Geraden (Abb. 26).

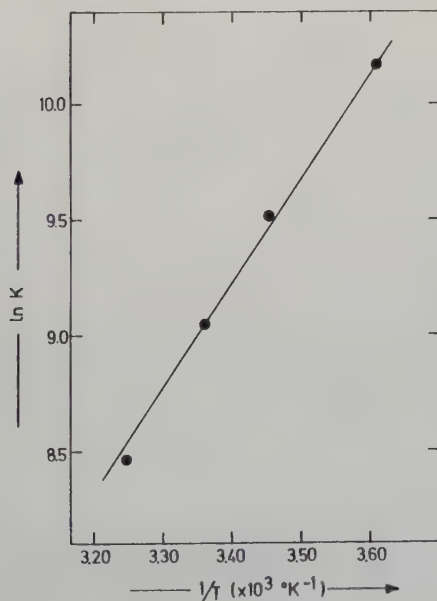


Abb. 26 : Van't Hoff-Plot für N3-Dns

C-3.1.2 Fluoreszenzeigenschaften der gebundenen Haptene:

Zur Methode der Linearpolarisation

Wird ein fluoreszierendes Molekül im Grundzustand S_0 , so angeregt, daß es in den ersten angeregten Zustand S_1 übergeht ($S_0 \rightarrow S_1$), so wird dies durch ein bestimmtes Übergangsdipolmoment beschrieben, dessen Vektor eine durch die Molekülstruktur bestimmte Richtung hat. Auch die Emission, die beim Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ stattfindet, wird durch ein Dipolmoment beschrieben, dessen Vektor mit dem des Anregungsdipols einen bestimmten Winkel φ einschließt (oftmals liegen bei planar gebauten Fluorophoren beide Vektoren in der Molekülebene (Platt, 1949) und sind parallel zueinander).

Werden nun in einer Lösung Fluorophore mit linear-polarisiertem Licht angeregt, so werden alle diejenigen Moleküle angeregt, deren Excitations-Dipolmoment parallel (oder nahezu parallel) zur Polarisationssebene und damit zum elektrischen Feldstärke-Vektor des anregenden Lichtes gerichtet sind. Unter der Annahme, daß während der Lebensdauer des angeregten Zustandes die Moleküle in ihrer Lage fixiert bleiben, ist das emittierte Licht auch in eine bestimmte Richtung, die durch den Winkel φ bestimmt wird, polarisiert. Solche Bedingungen können z. B. mit Fluorophoren in hochviskosen Flüssigkeiten wie Glycerin oder mit in Glas eingeschmolzenen fluoreszierenden Molekülen erreicht werden. Normalerweise ist bei kleineren Fluorophoren, die in Flüssigkeiten geringer Viskosität gelöst sind, die Brown'sche Molekülbewegung so schnell, daß innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes die excitierten Moleküle in der Lösung eine statistische Verteilung angenommen haben, so daß auch die Vektoren des emittierten Lichts statistisch verteilt sind und nicht in einer bestimmten Polarisationssebene liegen.

Mit Hilfe der linearen Fluoreszenzpolarisation lassen sich Aussagen über die Fluoreszenzanisotropie machen, die durch die Beziehung

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

definiert ist. $I_{\parallel}$ und $I_{\perp}$ sind die zum eingestrahltten Licht parallel und rechtwinklig polarisierten Emissionsintensitäten. r kann alle Werte von $-0,200$ bis $+0,400$ annehmen. Der höchste Wert wird dann erreicht, wenn Excitations- und Emissionsdipol zueinander parallel sind und die Moleküllage sich nicht verändert.

Zur Methode der Zirkularpolarisation

Gewöhnliches Licht besteht aus gleich großen Anteilen an links- und rechtsdrehend zirkularpolarisiertem Licht. Wird dieses Licht von einem Molekül, das sich in seinem Grundzustand (S_0) befindet, absorbiert, so können unterschiedlich große Anteile an links- und rechtsdrehend zirkularpolarisiertem Licht absorbiert werden. Absorptionsunterschiede dieser Art werden im Zirkulardichroismus (CD) als Absorptions-Anisotropiefaktor

$$g_{Ab,\lambda} = \frac{2(\epsilon_{l,\lambda} - \epsilon_{r,\lambda})}{\epsilon_{l,\lambda} + \epsilon_{r,\lambda}}$$

gemessen. $\epsilon_{l,\lambda}$ und $\epsilon_{r,\lambda}$ sind die molaren Extinktionskoeffizienten bei der Wellenlänge λ für die links- und rechtsdrehend zirkularpolarisierten Lichtkomponenten.

Im Gegensatz zum CD wird im CPL (Schlessinger et al., 1975; Steinberg, 1975) der Intensitätsunterschied zwischen links- und rechtsdrehend zirkulärpolarisiertem Licht gemessen, das ein Molekül beim Übergang vom ersten angeregten Zustand (S_1) in den Grundzustand (S_0) emittiert. Analog zum CD wird dieser Unterschied durch den Emissions-Anisotropiefaktor

$$g_{Em,\lambda} = \frac{2(f_{l,\lambda} - f_{r,\lambda})}{f_{l,\lambda} + f_{r,\lambda}}$$

ausgedrückt, wobei $f_{l,\lambda}$ und $f_{r,\lambda}$ die links- und rechtsdrehend zirkularpolarisierten Komponenten der Fluoreszenzemission bei der Wellenlänge λ ausdrücken. In Abb. 27 sind beide Methoden schematisch gegenübergestellt.

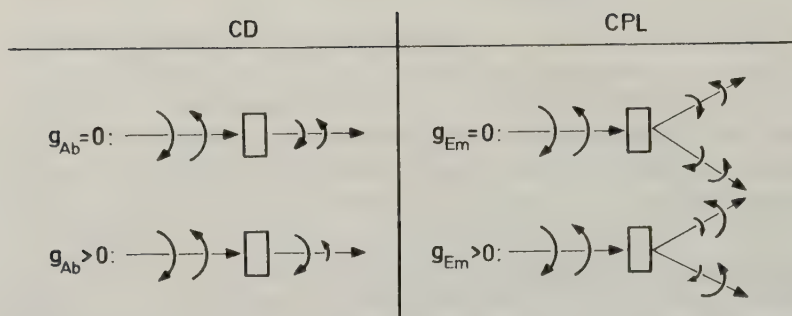


Abb. 27 : Schematische Gegenüberstellung von CD- und CPL- Spektrometrie

Anisotropien, die in CD- oder CPL-Spektren sichtbar werden, beruhen auf Asymmetrien im molekularen Bereich; beim CD im Grundzustand und beim CPL im ersten angeregten Zustand. Die Asymmetrie kann entweder durch die eigene Struktur des gemessenen Moleküls oder durch dessen asymmetrische Umgebung (induzierte Asymmetrie) zustande kommen.

Ergebnisse aus der Fluoreszenzspektroskopie

Die Wellenlänge des Emissionsmaximums sowie die Fluoreszenzintensität von Dansylderivaten werden sehr stark durch die Polarität der Umgebung des Fluorophors beeinflusst (Chen, 1967; Li et al., 1975). Auch mit den dansylierten Oligosacchariden war eine Verschiebung des Emissionsmaximums um 15 nm zum Kurzwelligen hin (von 500 auf 485 nm) bei gleichzeitigem Enhancement um den Faktor 1,8 zu beobachten, wenn als Lösungsmittel anstatt Wasser 50 %iger wässriger Äthylalkohol verwendet wurde. In DMF als Lösungsmittel war das Emissionsmaximum zum Langwelligen hin verschoben und lag bei 525 nm

Der Einfluß von MOPC 104E IgM auf die Fluoreszenz der gebundenen dansylierten Haptene wurde durch Vergleich der Fluoreszenzspektren von N3- und N4A-Dns, jeweils frei in Puffer gelöst sowie an MOPC

104E IgM gebunden (N3-Dns zu 45 % und N4A-Dns zu 75 %), bestimmt. Die Emissionsspektren der Haptene in An- und Abwesenheit von MOPC 104E waren identisch und zeigten weder eine Verschiebung des Emissionsmaximums noch eine Intensitätsänderung in der Emission, was darauf hindeutet, daß sich die Polarität der direkten Umgebung des Fluorophors nicht verändert hatte.

Ergebnisse aus Linearpolarisationsmessungen:

Die Fluoreszenz-Anisotropiefaktoren der einzelnen dansylierten Oligosaccharide, frei in Puffer (r_{frei}) und in Form der entsprechenden Antikörper-Hapten-Komplexe (r_{geb}), wurden bei 4°C und 25°C ermittelt. Verglichen wurden diese Werte mit Maximalwerten der Fluoreszenz-Anisotropie (r_{max}) der einzelnen Haptene bei 4°C in Glycerin (Brown'sche Rotation ist vernachlässigbar). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengestellt:

Tabelle 8: Fluoreszenz-Anisotropiefaktoren der dansylierten Oligosaccharide:

Hapten	r_{frei}		r_{geb}		r_{max}
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C
N3-Dns	0,038	0,022	0,276	0,275	0,332
N4-Dns	0,038	0,023	0,291	0,244	0,336
N5-Dns	0,044	0,025	0,174	0,126	0,323
N4A-Dns	0,034	0,021	0,157	0,123	0,319

Ergebnisse aus Zirkularpolarisationsmessungen

Die Aufnahme der CPL-Spektren der dansylierten Oligosaccharide - frei und an MOPC 104E IgM gebunden - wurde freundlicherweise von A. Gafni (Weizmann-Institute of Science, Rehovot, IL) durchgeführt.

In keinem Fall war ein Unterschied in der Intensität der links- und rechtsdrehend zirkularpolarisierten Komponente des emittierten Lichts feststellbar. Dies bedeutet, daß ein Emissions-Anisotropiefaktor der Haptene - wenn überhaupt vorhanden - höchstens sehr klein und unterhalb der Nachweisgrenze von $g_{Em} = 5 \times 10^{-5}$ ist.

C-3.1.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Die thermodynamischen Daten der Bindung von MOPC 104E IgM mit allen von uns sowie von Leon et al. (1970) und Young et al. (1971), untersuchten Haptene bei 4°C sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Durch Vergleich der thermodynamischen Parameter (insbesondere der Gibbs'schen freien Energie, ΔG) war es an Hand dieser Daten möglich, eine nähere Beschreibung der Bindungsstelle von MOPC 104E IgM zu geben. Kartieren von Bindungsstellen, die ausschließlich auf thermodynamischen Parametern beruhen, war schon früher an Immunglobulinen (Kabat, 1976; Schechter, 1972; Cisar et al., 1975) oder Enzymen (Berger und Schechter, 1970; Sharon und Chipman, 1969) durchgeführt worden. Durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligosaccharid-Haptene von unterschiedlicher Größe war es uns möglich, durch die Untersuchung der Haptenfluoreszenz im Antikörperkomplex weitere wichtige Informationen über die Bindungsstelle des Immunglobulins zu erhalten. Als Bezugspunkt für den Vergleich der Gibbs'schen freien Energie ΔG diente uns die freie Bindungsenergie des am stärksten gebundenen, nicht derivatisierten Haptens N4A-CHO (1) die -5,88 kcal/Mol beträgt und gleich 100 % gesetzt wurde.

Bereits das Monosaccharid Methyl- α -D-glucopyranose (1) trägt 37 % zu dieser Energie bei. Der Beitrag an freier Bindungsenergie beträgt bei den Disacchariden mit α -(1-2)-, α -(1-4)- und α -(1-6)-verknüpfter Glucose (3,2 und 4) 48 - 57 %. Von diesen Disacchariden hebt sich die (α -(1-3)-verknüpfte) Nigeroose (N2-CHO) (5) deutlich ab: die Bindungsenergie dieses kleinsten Gliedes der Reihe der α -(1-3)-Oligoglucane beträgt bereits 88 % des Maximalwertes.

Der Energiebeitrag, den eine dritte Glucoseeinheit zur Bindung beisteuert, ist relativ gering und, unabhängig von der Art der Verknüpfung, von gleicher Größenordnung:

Disaccharid	Trisaccharid	$\Delta(\Delta G)$
Isomaltose (4)	Isomaltotriose (6)	-0,42
Isomaltose (4)	Panose (7)	-0,56
Nigerose (5)	N3-CHO (8)	-0,68

Kein Unterschied in der freien Energie der Bindung wurde beobachtet bei den beiden Tetrasacchariden N4-CHO und N4A-CHO (9 und 10), sowie innerhalb der homologen Reihe der α -(1-3)-Oligoglucane, bei N3-CHO (8), N4-CHO (9) und N5-CHO (11).

Die Tatsache, daß ΔG bei der Reaktion von N2-CHO (5) mit MOPC 104E IgM bereits -5,15 kcal/Mol ($\approx 88\%$) beträgt und damit einen für ein Disaccharid sehr hohen Wert annimmt (vgl. die Bindungskonstanten für Disaccharide bei Cisar et al., 1975; Jolley et al., 1974; Streefkerk und Glaudemans, 1977) läßt sich nur mit einem sehr guten Einpassen der Nigerose in die Bindungsstelle des Antikörpers erklären, wo sich mit komplementären Proteinstrukturen ein optimaler dreidimensionaler Kontakt einstellt. Eine dritte Glucoseeinheit hat ebenfalls noch Kontakt mit der Bindungsstelle, wenn auch die Wechselwirkungen sehr viel geringer sind und die Spezifität für eine bestimmte glucosidische Bindung nicht wesentlich ausgeprägt zu sein scheint. Bei der Bindung von Tetra- und Pentasaccharid (9, 10, 11) ergibt sich kein darüber hinausgehender Energiebeitrag.

Ausgehend von diesen Befunden kann man sich die Bindungsstelle von MOPC 104E IgM folgendermaßen vorstellen:

In einer engen Höhle, in die das nichtreduzierende Ende der Oligosaccharide hineinpaßt, bieten die Aminosäurereste optimalen Kontakt für zwei α -(1-3)-verknüpfte Glucopyranoseringe (Nigerosyl-

Tabelle 9: Daten zur Bindung von 18 verschiedenen Haptenen an MOPC 104E IgM bei 4°C

Hapten	Kurzbezeichnung	K ($\times 10^{-4} \text{ m}^{-1}$)	ΔG e) (kcal/mol)	Beitrag zur freien Energie	ΔH f) (kcal/mol)	$-\Delta S_u$ h) (eu)
	1	0,0054 a)	-2,19	37 %		
	2	0,018 a)	-2,85	48 %		
	3	0,028 a)	-3,09	53 %		
	4	0,047 a)	-3,37	57 %		
	5	1,2 a)	-5,15	88 %		
	N2-CHO	0,10 a)	-3,79	64 %		
		0,13 a)	-3,93	67 %		
	N3-CHO	4,2 b)	-5,83	99 %		
	N4-CHO	3,5 b)	-5,74	98 %	-6,9 g)	+3,8 g)
	N4A-CHO	4,6 b)	-5,88	100 %		

11

gruppe). Am Ende dieser etwa 12 Å langen Höhle bieten sich in einem offeneren Teil weitere, jedoch wesentlich unspezifischere und lockerere Kontaktmöglichkeiten für eine dritte Glucoseeinheit. Ein schematisches Modell der Bindungsstelle, dem diese Vorstellung zugrunde liegt, ist in Abb. 28 gezeigt.

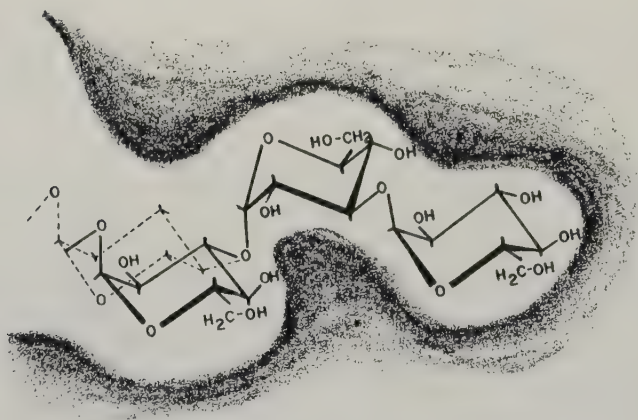


Abb. 28 : Schematisches Modell der Bindungsstelle von MOPC 104E IgM

Bei den Derivaten der Oligosaccharide ist auffallend, daß Modifikationen am reduzierenden Ende von N3- und N4-CHO (vgl. Alditole (12) und (13) sowie Dansylhydrazone (15) und (16)) zu einer Verringerung der Bindungsaffinität führen. Bei dem Pentasaccharid sind die Bindungskonstanten von nicht-derivatisiertem Hapten (11) und dansyliertem Oligosaccharid (18) gleich. Bei N4A-CHO (10) und dem entsprechenden Alditol (14) zeigt sich in den freien Bindungsenergien nur ein geringfügiger Unterschied; im Vergleich

dazu liegt die Affinität der Bindung von N4A-Dns an das Immunglobulin außerordentlich hoch. Interpretieren lassen sich diese Beobachtungen vor allem anhand der unterschiedlichen Beiträge von Enthalpie und Entropie zur freien Bindungsenergie (vgl. Tab. 9) in Zusammenhang mit den Fluoreszenzeigenschaften der gebundenen Haptene.

Für mehrere Hapten-Antikörper-Systeme wurden signifikante Änderungen in den Fluoreszenzeigenschaften einer Dansylgruppe beschrieben, die auf den Kontakt des fluoreszierenden Haptens mit dem Immunglobulin zurückzuführen sind (Parker et al., 1967; Pecht et al., 1971; Schlessinger et al., 1974). Insbesondere drücken sich diese Änderungen in Lage und Intensität des Emissionsspektrums sowie in einem induzierten CPL-Spektrum aus. Obwohl die Dansylgruppe an sich optisch nicht-aktiv ist, kann sie, infolge enger Wechselwirkungen mit dem asymmetrischen Immunglobulin, optische Aktivität erlangen (Blout und Stryer, 1959; Schlessinger et al., 1974). Diese induzierte optische Aktivität zeigt sich u.a. in dem anisotropen Verhalten der Emission des Fluorophors, das im CPL meßbar ist.

Im Hapten-Antikörper-Komplex von MOPC 104E IgM mit den dansylierten Oligosacchariden ließ sich kein direkter Einfluß des Immunglobulins auf die Fluoreszenzeigenschaften der Dansylgruppe nachweisen. Beides, die Identität der Emissionsspektren von freiem und an MOPC 104E IgM gebundenem Hapten, sowie das Fehlen einer durch das Protein induzierten Anisotropie der zirkularpolarisierten Dansyl-Emission deuten darauf hin, daß der Fluorophor keine ausgeprägten direkten Wechselwirkungen mit der Bindungsstelle eingeht und mehr oder weniger aus der Bindungsstelle in das Lösungsmittel herausragt.

Bei den Fluoreszenz-Linearpolarisationsmessungen zeigen alle dansylierten Haptene in gebundenem Zustand eine deutlich erhöhte Anisotropie (vgl. Tab. 8). Diese Erhöhung der Anisotropie ist zweifelsohne zum Teil auf die - relativ zur freien Beweglichkeit des ungebundenen Haptens sowie zur Lebensdauer des angeregten Zustandes der Dansylgruppe - sehr viel langsamere Brown'sche Ro-

tation des IgM/Haptenkomplexes zurückzuführen (Holowka und Cathou, 1976).

Auffallend sind die Unterschiede in der freien Beweglichkeit der Dansylgruppen bei gebundenem N3- und N4-Dns (15 und 16) einerseits und N5- und N4A-Dns (18 und 17) andererseits. Eine Derivatisierung am reduzierenden Ende des ausschließlich α -(1-3)-verknüpften Tri- und Tetrasaccharides, die sich in einer deutlich verminderten Affinität des Immunglobulins diesen Haptenen gegenüber anzeigt, äußert sich bei den entsprechenden Dansylderivaten durch eine wesentliche Einschränkung der freien Beweglichkeit des Fluorophors. Beide Effekte lassen sich durch eine sterische Hinderung der Bindung erklären, bei der die Dansylgruppen außerhalb der eigentlichen Bindungsstelle in ihrer Beweglichkeit durch das Protein eingeschränkt werden. Beim Pentasaccharid ragt die Dansylgruppe bereits weit genug aus der Bindungsstelle heraus, so daß einerseits keine sterische Hinderung und damit verbundene geringere Bindungsaffinität auftritt (die zu einer Minderung der Bindungsaffinität führen würde) und andererseits die Dansylgruppe einen wesentlich höheren Freiheitsgrad besitzt. Auch im Tetrasaccharid N4A-Dns ist die Dansylgruppe nicht so stark in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wie beispielsweise bei N4-Dns. Dies mag mit der unterschiedlichen glucosidischen Bindung am Nigerosylende beider Tetrasaccharide zusammenhängen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch der Unterschied in deren Affinität. Die deutlich erhöhte freie Energie der Bindung im Falle von N4A-Dns ist ausschließlich auf eine Erhöhung des Entropiebeitrages zurückzuführen; der Enthalpiebeitrag zur Bindung ist bei beiden Haptenen gleich.

Der Vergleich der Bindungsentropien von N4A-Dns (17) ($\Delta S_u = +11,7$ eu) und N4A-CH₂OH (14) ($\Delta S_u = +2,0$ eu) und der Unterschiede in den Enthalpiebeiträgen ΔH (-5,5 und -7,4 kcal/Mol) lassen vermuten, daß sich mit N4A-Dns weniger Wasserstoffbrücken ausbilden. Dies drückt sich durch den geringeren Enthalpiebeitrag aus. Außerdem muß angenommen werden, daß beim Binden von N4A-Dns ein besonders großer Anteil von Wassermolekülen aus der Hydrathülle des Immunglobulins

und/oder des Oligosaccharids freigesetzt wird, wodurch die Entropie deutlich erhöht wird, und was sich in einer insgesamt höheren freien Bindungsenergie bemerkbar macht. Möglicherweise hat ein Ablösen von Wassermolekülen aus der Hydrathülle auch die höhere Beweglichkeit des Fluorophors, sowie eine Erhöhung des maximalen Quenchs der "intrinsic" Proteinfluoreszenz zur Folge.

N3-Dns (15) hebt sich von den übrigen dansylierten Haptenen durch seinen negativen Entropiebeitrag ($\Delta S_u = -3,7$ eu) und den hohen Wert für die Enthalpieänderung ($\Delta H = -8,8$ kcal/Mol) ab. Diese Beiträge zur freien Bindungsenergie ΔG lassen sich dadurch erklären, daß im Falle des recht kurzen Oligosaccharides spezifische Wechselwirkungen der Dansylgruppe mit dem Protein in dem erweiterten Teil der Bindungshöhle stattfinden. Diese Wechselwirkungen bewirken eine Zunahme der Enthalpie, gleichzeitig mit der Einschränkung der freien Beweglichkeit des Fluorophors aber auch eine Abnahme der Entropie. Dadurch wird die Auswirkung der Enthalpie-Zunahme auf die Bindungsenergie teilweise kompensiert. Der Einfluß der Proteinumgebung auf die Fluoreszenz der Dansylgruppe ist jedoch zu gering, um sich im Emissions- und CPL-Spektrum bemerkbar zu machen.

Die von Young et al. (1971) aus Gleichgewichtsmessungen bei 4°C und 30°C bestimmten negativen Entropieänderungen beim Binden von N4A-CH₂OH an MOPC 104E IgM ($\Delta S_u = -5,7$ eu), sowie der Bindungsenthalpie ΔH (= -9,6 kcal/Mol) weichen deutlich von unseren Ergebnissen ab. Sowohl aus den Gleichgewichtskonstanten für N4A-CH₂OH bei 4°C und 24°C als auch durch isothermische Reaktionsenthalpiemessungen bei 25°C in einem LKB-Batch-Mikrokalorimeter (Modell 10700) (R. Zidovezki, G. Schepers und I. Pecht, unveröffentlichte Ergebnisse) wurde eine geringe positive Entropieänderung sowie eine Enthalpieänderung von ca. 7 kcal/Mol ermittelt. Gleiche Ergebnisse lieferte die isothermische Kalorimetrie für die Reaktion von MOPC 104E IgM mit N4-CHO (9).

Die Ergebnisse zusammenfassend, läßt sich die Bindungsstelle von MOPC 104E IgM in Form einer etwa 12 Å tiefen Höhle beschreiben, die sich an ihrem Ausgang zu einer Mulde erweitert. Die Kontaktamino-säuren innerhalb der Höhle bilden optimale Wechselwirkungen mit der terminalen, nicht-reduzierenden Nigerosylgruppe von Oligosacchariden aus. Aber auch Oligosaccharide, die keine terminale Nigerosylgruppe besitzen, werden in der Bindungsstelle gebunden, wenngleich auch die Affinität zu solchen Haptenen deutlich verringert ist. Die offene Mulde am Ende der Höhle bietet einer weiteren Glucoseeinheit Kontaktmöglichkeiten, wobei nicht unterschieden wird, wie diese dritte Glucose an das endständige Disaccharid gebunden ist.

C-3.2 Kinetische Untersuchungen

C-3.2.1 Reaktionskinetik:

Zur Methode des Fluoreszenz-Temperatursprung-Verfahrens:

Die Kenntnis des zeitlichen Ablaufs einer chemischen Reaktion, d.h. ihrer Kinetik, ist von besonderer Bedeutung für die Beurteilung ihres Mechanismus. Insbesondere seit der Einführung der chemischen Relaxationsmethoden (Eigen und De Maeyer, 1963) war es möglich, die Kinetik schnell ablaufender chemischer Reaktionen, wie z.B. der Antikörper-Hapten-Bindung (Froese und Sehon, 1975; Pecht und Lancet, 1977), zu messen. Wird ein System, daß sich bei der Temperatur T_1 im chemischen Gleichgewicht befindet, zum Zeitpunkt $t = 0$ sehr schnell, d.h. innerhalb weniger μsec (Temperatur-sprung), auf die Temperatur T_2 aufgeheizt, so stellt sich ein neues, der Temperatur T_2 zugehöriges chemisches Gleichgewicht ein. Die zeitliche Verfolgung dieser Gleichgewichtseinstellung mit nahezu trägheitslosen Methoden, z.B. durch Messung von optischen Parametern, liefert das Spektrum der chemischen Relaxation, das sich aus einer Summe von Exponentialfunktionen

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-t/\tau_i} + C$$

zusammensetzt (i bedeutet die Anzahl zeitlich entkoppelter Relaxationszeiten τ).

Wie in C-3.1.1 (S.87) bereits ausgeführt wurde, lassen sich Gleichgewichtszustände in Immunglobulin-Hapten-Systemen u.a. durch den spezifischen Quench der Proteinfluoreszenz bestimmen, der vom Grad . der Sättigung des Proteins mit Hapten abhängt. Die Verfolgung der zeitlichen Änderung des Fluoreszenzquenches bei der Einstellung eines neuen chemischen Gleichgewichts erlaubt im Fluoreszenz-Temperatursprung-Verfahren die Ermittlung der die Reaktion bestimmenden kinetischen Parameter. Außer dem eigentlichen Relaxationsprozeß ist bei dem Fluoreszenz-Temperatursprung-Verfahren noch eine weitere, innerhalb der Aufheizphase selbst verlaufende (d.h. äußerst schnelle), Änderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Diese rein physikalisch bedingte Änderung der Fluoreszenz des Ausgangsgleichgewichtes, die in Abb. 29 als ΔF_{ph} bezeichnet ist, kommt durch die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz an sich zustande und kann ein Vielfaches der Relaxationsamplitude A ausmachen.

Bei der Aufnahme der Relaxationsspektren wurde durch Verzögerung des Triggersignals um 20 μsec auf eine Registrierung des physikalischen Effektes verzichtet, um optimale Informationen über den eigentlichen Relaxationsprozeß zu erhalten.

Zur Auswertung der Relaxationsspektren:

Die digitalisierten und auf Magnetband gespeicherten Relaxationsspektren (s. B-4.2.1, S.41) wurden mit einem von Y. Blatt (Rehovot, IL) geschriebenen Computerprogramm (VB), das auf einem modifizierten Marquardt-Algorithmus (Fletcher, 1971) basiert, ausgewertet. Das Programm analysiert die experimentellen Daten gemäß der Funktion

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-t/\tau_i} + B_1,$$

wobei die Anzahl der Exponentialfunktionen i maximal gleich 3 sein darf. Das Programm liefert Werte für die Amplituden A_i , die Relaxationszeiten τ_i sowie die das neue Gleichgewicht charakterisierende "Baseline" B_1 . Die Abweichung der experimentellen von den theoretisch errechneten Daten des Relaxationsspektrums wurden mittels der Autokorrelations-Funktion, wie sie Grinvald und Steinberg (1974) für die Analyse multilexponentieller Fluoreszenz-

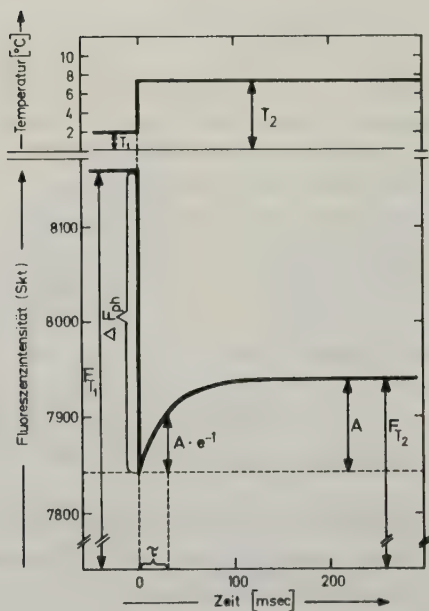


Abb. 29: Schematische Darstellung eines Relaxationsspektrums ($i = 1$), wie es bei Beobachtung des Fluoreszenzquenchens beim Temperatursprung-Verfahren auftritt:

Der Temperatursprung von T_1 nach T_2 findet zum Zeitpunkt $t = 0$ statt.

F_{T_1} Fluoreszenzintensität des Ausgangsgleichgewichts (bei T_1)

F_{T_2} Fluoreszenzintensität des neuen Gleichgewichts (bei T_2)

ΔF_{ph} temperaturbedingte Änderung der Fluoreszenz des Ausgangsgleichgewichtes ($T_1 \rightarrow T_2$)

A Amplitude der Relaxation (direkt proportional der bei T_2 durch die Gleichgewichtsverschiebung bedingten Änderung des Fluoreszenzquenchens)

τ Relaxationszeit der Gleichgewichtseinstellung

Decay-Spektren anwandten, auf systematische Fehler hin untersucht. Diese Analyse bot eine gute Basis für die Beurteilung, ob sich die Relaxationskurve bereits durch i oder erst durch $i + 1$ Exponentialfunktionen darstellen läßt (vgl. Abb. 30).

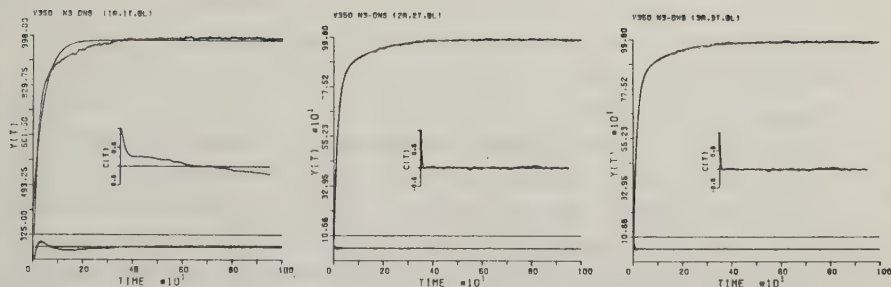


Abb. 30: Graphischer "output" des Computerprogramms VB zur Auswertung von Relaxationsspektren:

In allen drei Bildern entspricht die verrauschte Kurve dem experimentell ermittelten Relaxationsspektrum (Summe aus fünf Einzelexperimenten). Die experimentellen Bedingungen sind in B-4.2.1, S. 41 gegeben. Eine Funktion

$$f(t) = \sum_{i=1}^3 A_i \cdot e^{-t/\tau_i} + B1$$

wurde den experimentellen Daten angepaßt.

Teil- Bild	i	A ₁	τ_1 [msec]	A ₂	τ_2 [msec]	A ₃	τ_3 [msec]	B1
links	1	1	200					990
		1 (91)	42					982
mitte	2	0,6	30	0,4	250			990
		0,76 (94)	14,8	0,24 (29)	139			992
rechts	3	0,4	30	0,3	150	0,3	350	990
		0,76 (94)	14,8	0,19 (23)	139	0,05 (6)	139	992

Die oberen Werte stellen die Ausgangswerte für die Kurvenanpassung dar, die unteren Werte sind die durch die Anpassung erhaltenen Parameter. Relaxationsamplituden A sind als Bruchteil von 1 angegeben; in Klammern die Parameter in Biomation-Einheiten

Insert: Autokorrelationsfunktion (vgl. Grinvald und Steinberg, 1974)

Der Mechanismus einer chemischen Reaktion sowie die ihn bestimmenden Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Hin- und Rückreaktionen k_i und k_{-i} läßt sich durch eine eingehende Analyse der Konzentrationsabhängigkeit der Relaxationszeiten (Castellan, 1963)

sowie der entsprechenden Amplituden A_1 (Thusius, 1975) aufklären, wie dies bei Jovin (1975) ausführlich beschrieben ist und von Lancet und Pecht (1976) erstmals auf die Reaktion eines Immunglobulins mit seinem entsprechenden Hapten angewendet wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse des Reaktionsmechanismus zwischen MOPC 104E IgM und N4-Dns erfolgte mit Computerprogrammen von D. Lancet (Lancet und Pecht, 1976; Lancet, 1978). Diese Programme basieren auf den die von Castellan (1963) und Jovin (1975) beschriebenen Formalismen zur Analyse der Konzentrationsabhängigkeit von Relaxationszeit und Amplitude (insbesondere die Verwendung der "g-Matrix"), und benutzen zur Auffindung der zu bestimmenden Parameter den Powell-Algorithmus (Powell, 1971).

Ergebnisse und Diskussion:

Messungen zur Kinetik der Bindungsreaktion von MOPC 104E IgM mit dansylierten Oligosaccharid-Haptenen wurden mittels der Fluoreszenz-Temperaturprungmethode (Jovin, 1975) in einer bei Rigler et al. (1974) beschriebenen Apparatur durchgeführt. Die Neueinstellung des chemischen Gleichgewichtes nach einem Temperaturprung von $\Delta T = 5,3^\circ\text{C}$ wurde zeitlich verfolgt, indem die Intensität der "intrinsic" Proteinfluoreszenz als Relaxationsspektrum registriert wurde. Hierbei wurde ausgenutzt, daß die Proteinfluoreszenz durch gebundenes Hapten verringert wird (Fluoreszenzquench, vgl. C-3.1.1, S.87). Relaxationsspektren wurden mit allen dansylierten Haptenen bei $7,3^\circ\text{C}$, sowie mit den beiden Tetrasacchariden N4-Dns und N4A-Dns zusätzlich bei $17,3^\circ\text{C}$ und $25,3^\circ\text{C}$, bei verschiedenen Haptenkonzentrationen aufgenommen. Die Daten mehrerer unter identischen Bedingungen aufgenommener Relaxationsspektren wurden nach Digitalisieren aufsummiert und auf Magnetband gespeichert. Durch Summation mehrerer Spektren konnte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wesentlich verbessert werden. Mit Hilfe eines Computerprogramms (VB), dem eine modifizierte Form des Marquart-Algorithmus (Fletcher, 1971) zugrunde lag, wurden Zeitkonstanten und Amplituden der Relaxationsspektren berechnet. Diese Analyse ergab, daß sich die Relaxationsspektren durch die

biexponentielle Funktion

$$f(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} + B_1$$

beschreiben lassen (vgl. Abb. 30 , S.117), bei denen die beiden Relaxationszeiten τ_1 und τ_2 deutlich um etwa den Faktor 10 voneinander getrennt sind. Da die Relaxationsprozesse oftmals nicht abgeschlossen waren, bevor die externe Kühlung der Temperatursprungzelle wirksam wurde, konnten sich Schwierigkeiten in der Ermittlung von τ_2 und A_2 ergeben. Mit dem verwendeten Computerprogramm VB war es jedoch möglich, auch aus noch nicht vollständig abgeschlossenen Gleichgewichtseinstellungen Relaxationszeiten und -amplituden zu ermitteln, indem die das neue Gleichgewicht beschreibende "Baseline" B_1 ebenfalls als freier Parameter zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der Analysen der Relaxationsspektren sind in den Tabellen 10 - 13 zusammengestellt.

Tabelle 10: Analyse der Relaxationsspektren von MOPC 104E Igt1/N3-Dns ($Q_{\max} = 29 \%$)

$[Ab_t]$ ($\times 10^7$ n)	$[H_t]$ ($\times 10^6$ m)	A_1	τ_1 (msec)	A_2	τ_2 (msec)
$T_1 = 2,0^\circ\text{C}$ $T_2 = 7,3^\circ\text{C}$ $K_{(7,3^\circ\text{C})} = 2,18 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$					

6,88	4,2	1,50	29,3	1,00	172
6,74	12,2	3,50	23,0	2,50	176
6,67	20,2	8,50	22,7	3,00	152
6,47	27,5	6,00	20,9	3,88	190
6,60	41,0	8,25	20,3	4,38	125
6,63	50,3	11,13	19,9	4,00	156
6,63	54,3	11,63	17,7	3,63	144
6,50	61,1	11,25	16,3	4,13	154
6,44	68,3	11,75	14,8	3,63	139
6,47	117,7	11,63	12,9	3,00	121

Anmerkungen zu Tabellen 10 - 13:

Jeder Datensatz wurde aus dem Summen-Relaxationsspektrum von mindestens fünf Einzelexperimenten ermittelt. Die "overall" Assoziationskonstante K bei der jeweiligen Temperatur T wurde aus der Assoziationskonstante für 4°C und dem jeweiligen ΔH (Tab. 9, S.107) erhalten. Amplituden A sind in $\%$ des Gesamtsignals angegeben.

Tabelle 11: Analyse der Relaxationsspektren von MOPC 104E IgM/N4-Dns ($Q_{\max} = 25 \%$)

$[Ab_t]$ ($\times 10^7$ n)	$[H_t]$ ($\times 10^6$ m)	A_1	τ_1 (msec)	A_2	τ_2 (msec)
$T_1 = 2,0^\circ\text{C} \quad T_2 = 7,3^\circ\text{C} \quad K(7,3^\circ\text{C}) = 1,95 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$					
6,7	4,3	5,38	29,3	3,88	300
6,6	10,6	8,25	31,0	5,25	363
6,5	26,1	11,13	23,2	4,13	273
6,7	50,0	12,00	19,4	4,75	304
6,6	106	12,00	13,3	3,25	308
6,1	170	10,75	8,5	2,13	254
$T_1 = 12,2^\circ\text{C} \quad T_2 = 17,5^\circ\text{C} \quad K(17,5^\circ\text{C}) = 1,39 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$					
15,73	9,92	3,25	12,2	2,00	93,9
15,27	15,4	5,50	11,8	3,00	113
14,70	22,2	6,13	11,6	3,75	103
8,28	37,6	8,13	10,4	3,63	106
7,71	48,6	8,88	10,4	3,38	105
7,56	66,8	9,25	9,2	3,00	105
$T_1 = 20,0^\circ\text{C} \quad T_2 = 25,3^\circ\text{C} \quad K(25,3^\circ\text{C}) = 1,08 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$					
8,28	2,1	0,75	12,9	0,88	101
8,07	4,1	1,25	10,3	0,88	88,1
8,28	8,4	2,38	12,8	2,38	240
7,87	11,9	3,13	10,6	2,25	97,9
7,49	15,1	3,38	9,3	2,75	93,7
8,07	34,6	6,38	6,5	3,75	65,0
7,87	43,6	7,25	7,3	3,75	69,8
8,28	62,6	8,75	6,2	3,88	60,0
7,87	79,3	9,38	5,4	3,63	55,1
7,49	94,5	9,25	4,7	3,50	44,8
8,19	157	9,25	3,4	2,75	49,7
8,11	196	8,00	3,3	2,00	46,2
7,83	249	6,25	2,5	1,75	43,1

Tabelle 12: Analyse der Relaxationsspektren von MOPC 104E IgM/N5-Dns ($Q_{\max} = 23 \%$)

$[Ab_t]$ ($\times 10^7$ n)	$[H_t]$ ($\times 10^6$ m)	A_1	τ_1 (msec)	A_2	τ_2 (msec)
$T_1 = 2,0^\circ\text{C} \quad T_2 = 7,3^\circ\text{C} \quad K(7,3^\circ\text{C}) = 3,46 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$					
6,9	4,91	4,13	26,1	2,50	279
6,8	9,8	6,25	23,3	3,25	261
6,7	24,0	8,88	17,7	4,38	281
7,1	46,7	9,50	14,6	3,00	263
6,9	80,0	8,88	11,3	2,50	254
6,9	135	7,45	8,9	1,20	231

Tabelle 13: Analyse der Relaxationsspektren von MOPC 104E IgM/N4A-Dns ($Q_{\max} = 35 \%$)

$[Ab_t]$ ($\times 10^7$ n)	$[H_t]$ ($\times 10^6$ m)	A_1	τ_1 (msec)	A_2	τ_2 (msec)
$T_1 = 2,0^\circ\text{C}$	$T_2 = 7,3^\circ\text{C}$	$K(7,3^\circ\text{C}) = 12,6 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$			
6,9	0,9	0,99	37,8	5,56	296
6,9	8,0	3,80	33,8	17,98	218
6,9	12,0	5,63	35,3	14,50	196
6,9	18,0	5,50	24,9	13,25	171
6,9	31,3	5,75	21,5	8,63	135
7,3	46,3	5,00	17,8	5,93	95,2
6,9	70,0	4,14	13,2	5,29	82,7
7,3	91,7	3,75	11,6	4,75	62,1
7,3	137	3,13	7,9	2,25	50,4
7,3	229	2,75	5,2	1,63	35,3
$T_1 = 12,2^\circ\text{C}$	$T_2 = 17,5^\circ\text{C}$	$K(17,5^\circ\text{C}) = 8,91 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$			
8,07	2,1	1,13	23,3	2,00	209
7,87	4,2	1,63	16,6	4,88	202
7,49	7,9	3,38	21,9	7,38	189
7,87	12,5	4,00	21,8	12,00	173
7,49	15,8	4,38	17,8	9,88	189
7,35	23,3	4,50	19,5	11,75	167
8,11	38,6	6,88	16,6	12,50	131
7,79	53,5	7,00	15,6	10,63	132
7,35	73,9	5,50	12,9	8,25	118
7,28	115	5,00	10,4	5,50	107
$T_1 = 20,0^\circ\text{C}$	$T_2 = 25,3^\circ\text{C}$	$K(25,3^\circ\text{C}) = 6,91 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$			
8,07	2,1	1,50	46,1	3,38	163
7,87	4,2	3,38	39,3	3,50	197
8,07	6,4	5,38	47,5	4,50	174
7,87	8,3	5,25	34,3	6,13	149
8,28	17,5	6,38	30,4	9,50	109
7,49	23,8	3,88	13,2	12,25	76
6,84	28,9	4,75	8,7	13,13	73
7,87	41,6	7,38	10,4	13,00	64
7,49	59,4	7,38	7,3	11,13	51
7,15	75,6	4,88	6,7	9,50	43

Keinerlei Relaxationsprozesse wurden unter den gewählten experimentellen Bedingungen mit Hapten oder MOPC 104E IgM alleine beobachtet. Hieraus läßt sich schließen, daß die mehrstufige (mindestens zweistufige) Gleichgewichtseinstellung, die im Protein-Ligand-Komplex in der Proteinfluoreszenz sichtbar ist, ausschließlich auf die Wechselwirkung von Immunglobulin mit dem Hapten zurückzuführen ist.

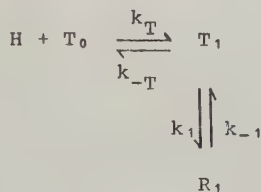
Die schnellere der beiden Relaxationszeiten (τ_1) zeigt für alle Haptene eine lineare Konzentrationsabhängigkeit (beim Auftragen von $1/\tau$ versus $[H] + [Ab]^*$) und läßt sich somit einer bimolekularen Reaktion (Assoziation) zuschreiben. Die langsamere Relaxationszeit (τ_2) ist in dem untersuchten Konzentrationsbereich der α -(1-3)-Oligoglucose weitgehend konzentrationsunabhängig oder strebt zumindest bei zunehmender Haptenkonzentration einem Grenzwert zu, wodurch ein monomolekularer Reaktionsschritt (Isomerisation) gekennzeichnet ist, der mit dem bimolekularen Schritt verknüpft ist.

Erstmals wurde von D. Haustein (1971; Haustein et al., 1977) neben dem Assoziationsschritt ein langsamerer, konzentrationsunabhängiger Schritt bei einer Antikörper-Hapten-Reaktion beobachtet und einer Konformationsänderung des Antikörpers nach Haptenbindung zugeschrieben. Sehr eingehende Untersuchungen des Mechanismus der Antikörper-Hapten-Reaktion wurden mit dem homogenen Myelomprotein MOPC 460 IgA durchgeführt, das Spezifität gegen DNP und dessen Analoga aufweist und bei dem ebenfalls eine zweite, langsamere Reaktionszeit gefunden wurde (Lancet und Pecht, 1976; Lancet, 1978). Durch die genaue Analyse der Konzentrationsabhängigkeit von Relaxationszeiten und -amplituden konnten die Autoren zeigen, daß die Antikörper-Hapten-Reaktion nach dem allosterischen Modell von Monod, Wyman und Changeux (1965) verlief. Da nach unseren Mes-

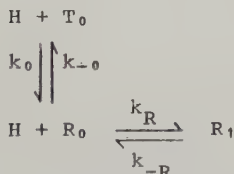
*) Anstelle der Summe der Konzentrationen der freien Reaktionspartner $[H] + [Ab]$ wurde die Konzentration des gesamten Haptens $[H_t]$ eingesetzt, da für nahezu alle Haptenkonzentrationen galt $[H_t] \gg [Ab_t]$ und damit $[H_t] \approx [H] + [Ab]$.

sungen (vgl. Tab. 10 - 13) für die Reaktion von MOPC 104E IgM mit N4-Dns bei 25°C das umfangreichste Datenmaterial vorlag, wurde diese als Beispiel ausgewählt und auf Übereinstimmung mit einem der nachfolgenden von Lancet und Pecht (1976) vorgeschlagenen Mechanismen zur Antikörper-Hapten-Reaktion analysiert.

Modell 1*): Isomerisierung des Proteins findet im Komplex statt:

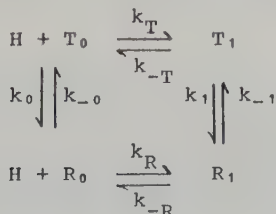


Modell 2: Isomerisierung findet am freien Protein statt:



Durch Kombination beider Modelle ergibt sich

Modell 3: Isomerisierung findet sowohl am freien Protein als auch am Protein-Ligand-Komplex statt:



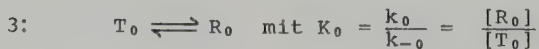
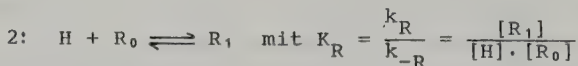
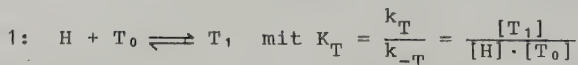
*) In diesem und den folgenden Modellen bedeutet H Hapten; T und R sind der Nomenklatur Monod's entnommen (Monod et al., 1965) und bezeichnen verschiedene konformative Zustände des Proteins und zwar T den schlechter und R den besser bindenden.

Für den Mechanismus der Reaktion von MOPC 104E IgM mit N4-Dns bei 25°C konnten die Modelle 1 und 2 ausgeschlossen werden:

- a) Aus der Konzentrationsabhängigkeit von $\lambda_1 = 1/\tau_1$ berechnet sich für die Hinreaktion eine Geschwindigkeitskonstante für den Assoziationsschritt von $1,24 \times 10^6 \cdot \text{sec}^{-1}$ und für die Rückreaktion von $96,1 \text{ sec}^{-1}$ (aus Steigung und Ordinatenabschnitt der Geraden in Abb. 31a, S.128). Die sich daraus berechnende Konstante für den Assoziationsschritt beträgt $1,29 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ und ist somit größer als die mittels der fluorimetrischen Titration bestimmten "overall" Gleichgewichtskonstante ($K = 1,08 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$). Dies läßt sich jedoch nur für den Fall erklären, daß der beobachtete Assoziationsschritt mit dem Protein im besser bindenden Zustand (R-state) stattfindet. Hieraus folgt, daß der Mechanismus 1 für die Reaktion ausgeschlossen werden muß.
- b) Aus der Konzentrationsabhängigkeit von $\lambda_2 = 1/\tau_2$ ersieht man (vgl. Abb. 31c), daß λ_2 mit zunehmender Haptenkonzentration langsamer ansteigt und schließlich ein Plateau erreicht, wo λ_2 konzentrationsunabhängig wird. Ein solches Verhalten ist aber nur für den Mechanismus 1 zu erwarten. Bei Mechanismus 2 sollte die Konzentrationsabhängigkeit des Isomerisations-schrittes bei kleinen Haptenkonzentrationen genau umgekehrt verlaufen: Einstellung des Plateaus nach anfänglichem Absinken von λ_2 (vgl. Lancet und Pecht, 1976).

Nachdem für die Reaktion die Mechanismen 1 und 2 ausschieden, wurde Mechanismus 3 als der umfassendere für die Reaktion betrachtet. Mechanismus 3 besteht aus 4 Einzelreaktionen, von denen drei als thermodynamisch unabhängig angesehen werden können, die vierte dann aber abhängig ist:

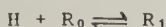
Thermodynamisch unabhängige Reaktionen:



Thermodynamisch abhängige Reaktion:



Dementsprechend erwartet man für eine Reaktion, die nach Mechanismus 3 abläuft, drei Relaxationszeiten, zwei schnelle, die Assoziationsschritte betreffende und eine langsamere, der Isomerisation zuzuordnende (Castellan, 1963). Da der beobachtete Assoziationsschritt dem Gleichgewicht



zugeschrieben werden mußte (vgl. oben), konnte davon ausgegangen werden, daß der andere Assoziationsschritt zwar vorhanden, jedoch nicht durch einen optischen Effekt sichtbar war. Gleichzeitig wurde angenommen, daß der beobachtete Assoziationsschritt mit dem Protein im besser bindenden Zustand der am schnellsten ablaufende Prozeß ist. Hieraus ergab sich für die g -Matrix (Castellan, 1963; Jovin, 1975):

$$\underline{g} = \begin{Bmatrix} g_{11} & g_{12} & g_{13} \\ g_{21} & g_{22} & g_{23} \\ g_{31} & g_{32} & g_{33} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \frac{1}{R_0} + \frac{1}{R_1} + \frac{1}{H} & \frac{1}{H} & -\frac{1}{R_0} \\ \frac{1}{H} & \frac{1}{T_0} + \frac{1}{T_1} + \frac{1}{H} & \frac{1}{T_0} \\ -\frac{1}{R_0} & \frac{1}{T_0} & \frac{1}{T_0} + \frac{1}{R_0} \end{Bmatrix}$$

Mit den bei Castellan (1963) und Jovin (1975) abgeleiteten Formalismen läßt sich die Konzentrationsabhängigkeit der schnellen (Assoziations-)Relaxationszeit τ_1 mittels

$$\lambda_1 = 1/\tau_1 = g_{11} \cdot (k_R \cdot R_0 \cdot H)$$

und der entsprechenden Relaxationsamplitude mittels

$$A_1 = \frac{1}{g_{11} \cdot \Delta b_t} \cdot \Delta f_R \cdot \Delta \ln K_R = \frac{1}{g_{11} \cdot \Delta b_t} \cdot \Delta f_R \cdot \frac{\Delta T}{RT^2} \cdot \Delta H_R$$

beschreiben. Die Konzentrationsabhängigkeit der langsameren Zeitkonstanten und Amplitude ergibt sich nach:

$$\lambda_2 = \frac{1}{\tau_2} = \frac{|g_3|}{|g_2|} (k_1 \cdot T_1 + k_0 \cdot T_0)$$

$$A_2 = \frac{|g_2|}{|g_3|} (Q_{13} \cdot \Delta f_R + Q_{23} \cdot \Delta f_T + \Delta f_0) (Q_{13} \cdot \Delta H_R + Q_{23} \cdot \Delta H_T + \Delta H_0) \cdot \frac{\Delta T}{RT^2 \cdot Ab_T}$$

$$\text{mit } Q_{13} = \frac{1}{|g_2|} \cdot (g_{23}g_{12} - g_{13}g_{22}) \text{ und}$$

$$Q_{23} = \frac{1}{|g_2|} \cdot (g_{12}g_{13} - g_{23}g_{11}).$$

In diesen Formeln bedeuten:

$|g_i|$: Wert der i-ten Haupt-Unterdeterminante der g-Matrix

g_{ij} : Element der g-Matrix in der i-ten Reihe und j-ten Spalte

T_0, R_0, H, T_1 und R_1 : Molare Konzentrationen von freiem Protein (T_0, R_0), freiem Hapten (H) und Komplex (T_1, R_1) im Gleichgewicht

Ab_t : Gesamtprotein-Konzentration

Δf_i und ΔH_i : Dem i-ten Reaktionsschritt zugehörige Änderungen der normalisierten Fluoreszenz und der Enthalpie

(vergleiche zu diesen Formeln auch Lancet und Pecht, 1976).

Eine Analyse der experimentellen Daten τ_1, τ_2, A_1 und A_2 anhand dieser Formeln ergab die Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Teilreaktionsschritte (K_i), deren Enthalpiebeiträge (ΔH_i), sowie die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Hin- und Rückreaktionen (k_i und k_{-i}). Für die gesamte Analyse wurden die "overall" Gleichgewichtskonstante (aus fluorimetrischer Titration, $K = 1,08 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$), der maximale Quench ($Q_{\max} = 25 \%$) sowie die maximale Fluoreszenzänderung des Assoziationsschrittes $H + T_0 \rightleftharpoons$ ($\Delta f_T = 0$) als Konstanten benutzt. Die ermittelten kinetischen und thermodynamischen Parameter der Reaktion von MOPC 104E IgM mit N4-Dns bei 25,3°C sind in Tab. 14 zusammengestellt:

Tabelle 14: Kinetische und thermodynamische Parameter der Reaktion von MOPC 104E IgM mit N4-Dns bei 25°C:

i ^{a)}	K_1	k_1	k_{-1}	ΔG_1 (kcal/mol)	ΔH_1 ^{b)} (kcal/mol)
T	$8,92 \times 10^3 \text{ m}^{-1}$	-	-	-5,37	-12,5
R	$1,29 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$	$1,24 \times 10^6 \text{ m}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	$96,1 \text{ sec}^{-1}$	-5,58	-7,9
0	0,90	$3,80 \text{ sec}^{-1}$	$4,22 \text{ sec}^{-1}$	+0,06	-3,3
1	1,30	$16,9 \text{ sec}^{-1}$	$13,0 \text{ sec}^{-1}$	-0,15	+1,9
"overall" ^{c)}	$1,08 \times 10^4 \text{ m}^{-1}$			-5,48	-5,5

- a) Die Bezeichnung für die Teilschritte i beziehen sich auf den Mechanismus 3.
- b) Die Enthalpiebeiträge zu den einzelnen Teilreaktionsschritten sind aus den Amplituden des langsamen Relaxationsprozesses berechnet. Wegen der damit verbundenen Unsicherheit (u.a. infolge nicht-Erreichens der "Baseline" bei langsamen Relaxationsprozessen) haben die so errechneten ΔH_1 nur grob orientierenden Charakter.
- c) Daten für die "overall" Bindung wurden durch fluorimetrische Titration (vgl. C-3.1.1, S.98) bestimmt.

In Abb.31 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Relaxationszeiten (a und c) und der entsprechenden Amplituden (b und d) dargestellt. Die Punkte stellen die experimentell ermittelten Werte dar, die durchgezogenen Linien wurden nach den best-passenden Parametern für Mechanismus 3 (vgl. Tab. 14) kalkuliert.

Die gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den theoretisch ermittelten Konzentrationsabhängigkeiten von Relaxationszeiten und Amplituden bekräftigt das Vorliegen des von Lancet und Pecht (1976) für die Hapten-Antikörper-Reaktion vorgeschlagenen "Square"-Mechanismus (Modell 3, S.123), bei dem das Immunglobulin in zwei im Gleichgewicht miteinander stehenden Konformationen auftritt. Durch Haptenbindung wird das Gleichgewicht zu der "besser-bindenden" Proteinkonformation verschoben.

MOPC 104E IgM ist das erste Myelomprotein der IgM-Klasse, bei dem durch reaktionskinetische Untersuchungen neben dem linear-kon-

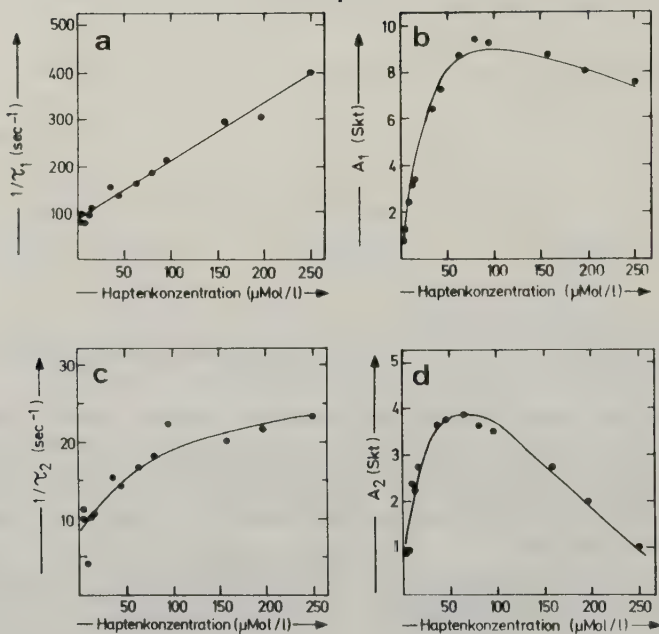


Abb. 31: Konzentrationsabhängigkeit von Relaxationszeiten und Amplituden bei der Reaktion von MOPC 104E IgM mit N4-Dns bei 25°C (vgl. Text).

zentrationsabhängigen Assoziationsschritt ein monomolekularer Isomerisationsschritt beobachtet wurde. Zuerst wurde dieses Verhalten von Lancet und Pecht (1976) bei dem Myelomprotein MOPC 460 IgA mit Anti-DNP-Spezifität beobachtet und ausführlich diskutiert. In der Zwischenzeit wurde der gleiche Reaktionsmechanismus auch für die IgA-Myelomproteine mit Anti-β-(1-6)-Oligogalaktan-Spezifität J539 und XRPC 24 gefunden (Vuk-Pavlović et al., 1978). Die Frage, ob der von Lancet und Pecht postulierte Mechanismus generell für Antikörper-Hapten-Reaktionen zutrifft, kann nach diesen wenigen Beispielen nicht beantwortet werden. Interessant scheint in diesem Zusammenhang jedoch die Feststellung, daß bei früheren reaktionskinetischen Studien an XRPC 24 nur eine einzige Relaxationszeit gefunden wurde, die dem Assoziationsschritt zuzuordnen war (Pecht, 1975).

- C-4 Untersuchung thermisch induzierbarer Zustandsänderungen
 von MOPC 104E IgM
- C-4.1 Optische Methoden

Das Temperaturverhalten von MOPC 104E IgM wurde mit optischen Methoden (UV-Differenz-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie, Messung des Zirkulardichroismus sowie der optischen Rotation) untersucht.

Ergebnisse aus der Temperaturdifferenz-UV-Spektroskopie

Temperaturdifferenz-Spektren wurden nach der in B-5.1.1, S.44 gegebenen Vorschrift und Reihenfolge aufgenommen. Es wurde hierbei beobachtet, daß nach Registrierung eines jeden Spektrums der Ausgangswert (bei 320 nm) nicht mehr genau reproduziert werden konnte. Außerdem lagen die Ausgangswerte der einzelnen Spektren bei unterschiedlichen Meßwerten (Unterschied bis $\pm 0,0008 \text{ cm}^{-1}$).

Auf Grund von Temperaturmessungen mit Hilfe von Thermistoren in den (thermisch nicht gegeneinander isolierten) Küvettenhaltern konnte gezeigt werden, daß zwischen diesen ein Wärmeaustausch stattfand, der sehr langsam geschah und möglicherweise zu einer langsamen Veränderung in der Geometrie von Küvettenhalter, Metallblende etc. und damit zu einer Drift im Spektrum führte.

Bei Korrektur der Spektren wurde davon ausgegangen, daß in erster Näherung diese Drift unabhängig von der Wellenlänge ist und nur zeitlich, mit der Registrierdauer, linear zunimmt. Außerdem wurde angenommen, daß der Ausgangswert aller Differenzspektren (bei 320 nm) der gleiche ist.

Durch Parallelverschiebung und linearen Diftausgleich wurden die Temperaturdifferenzspektren korrigiert und auf das Spektrum bei $7,3^\circ\text{C}$ als Grundlinie bezogen (Abb. 32). Die isosbestischen Punkte bei 287,5 nm, 290,5 nm sowie 293 nm können nicht im klas-

sischen Sinn (Vorliegen von miteinander im Gleichgewicht befindlichen Zuständen) gedeutet werden (Cooper, 1974). Konformationsänderungen sollten sich vielmehr in einem nicht linearen Verlauf der Temperaturabhängigkeit der optischen Dichte bemerkbar machen. Wie aus dem Insert in Abb. 32 zu ersehen ist, wurde für MOPC 104E IgM kein solcher Hinweis erhalten.

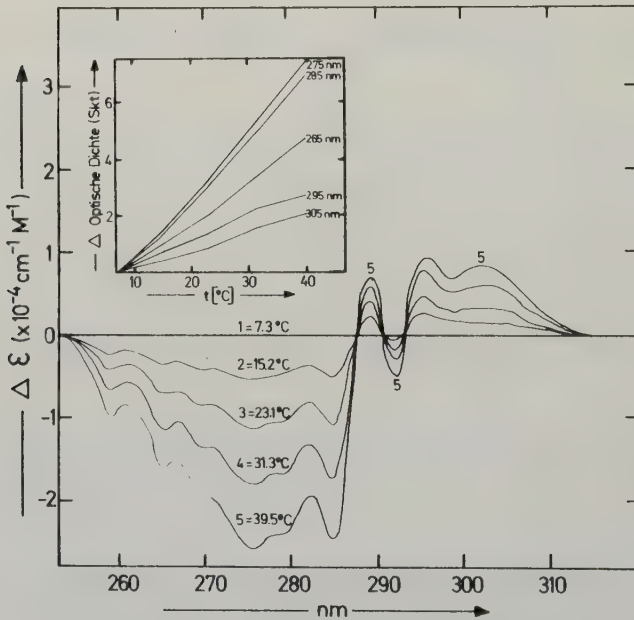


Abb. 32: Temperaturdifferenz-UV-Absorptionsspektrum von MOPC 104E IgM (s. Text)

Insert: Temperaturabhängigkeit der optischen Dichte bei verschiedenen Wellenlängen

Ergebnisse aus den Messungen des Zirkulardichroismus:

CD-Spektren von MOPC 104E IgM bei verschiedenen Temperaturen (8°C, 23°C und 32°C) sind in Abb. 33 gezeigt (experimentelle Bedingungen s. B-5.1.2, S.45)

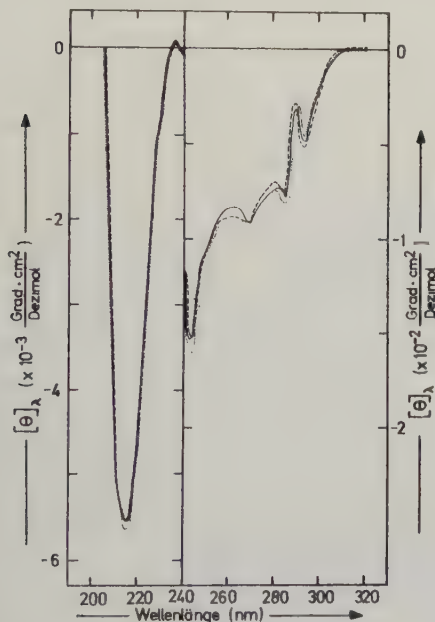


Abb. 33 : Temperaturabhängigkeit des Zirkulardichroismus von MOPC 104E IgM

— : T = 8°C
 - - - : T = 23°C
 : T = 32°C

Die Elliptizität ist auf ein mittleres Molekulargewicht von 107,2 bezogen (Ashman et al., 1971).

Keine strukturellen Änderungen sind aus den CD-Spektren bei den verschiedenen Temperaturen erkennbar. Die kleinen Unterschiede, insbesondere zwischen 240 und 300 nm, sind nicht signifikant und liegen innerhalb der Fehlergrenze. Auffallend ist die stark negative Elliptizität mit einem Minimum bei 217 nm, die allen Immunglobulinen gemeinsam ist und von der Faltblatt-Struktur der einzelnen Ketten herrührt (Ashman et al., 1971; Dorrington und Smith, 1972).

Ergebnisse aus den Messungen der optischen Rotation:

Die Temperaturabhängigkeit von MOPC 104E IgM wurde ebenfalls mit der optischen Rotation bei 589 nm gemessen (experimentelle Einzelheiten siehe B-5.1.3, S.46). Das Ergebnis ist in Abb. 34 dargestellt.

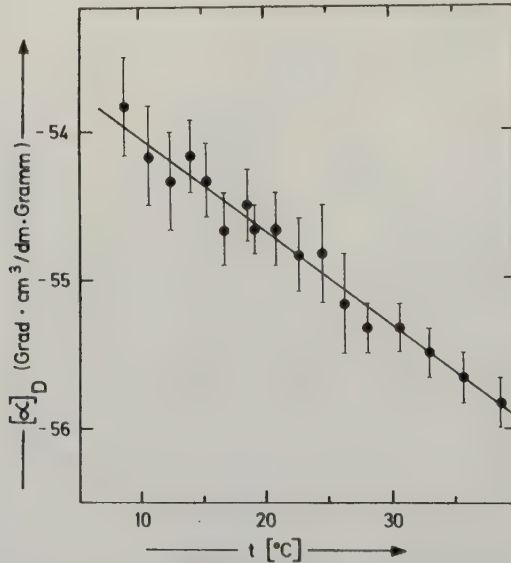


Abb. 34: Temperaturabhängigkeit der optischen Rotation von MOPC 104E IgM

Die senkrechten Striche bedeuten die Standardabweichungen aus mehreren Experimenten und liegen alle innerhalb der vom Hersteller angegebenen Meßgenauigkeit des Polarimeters.

Auch aus der Änderung der optischen Drehung des IgM mit Änderung der Temperatur kann kein Rückschluß auf eine diskrete, thermisch bedingte Umwandlung gezogen werden. Die Abhängigkeit läßt sich vielmehr innerhalb der Fehlerbreite als linear ansehen.

Ergebnisse aus der Fluoreszenzspektroskopie:

MOPC 104E IgM änderte die Intensität seiner "intrinsic" Fluoreszenzemission ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 340 \text{ nm}$) in erster Näherung linear mit steigender und sinkender Temperatur (Abb. 35) und ließ keinen konformationellen Übergang erkennen.

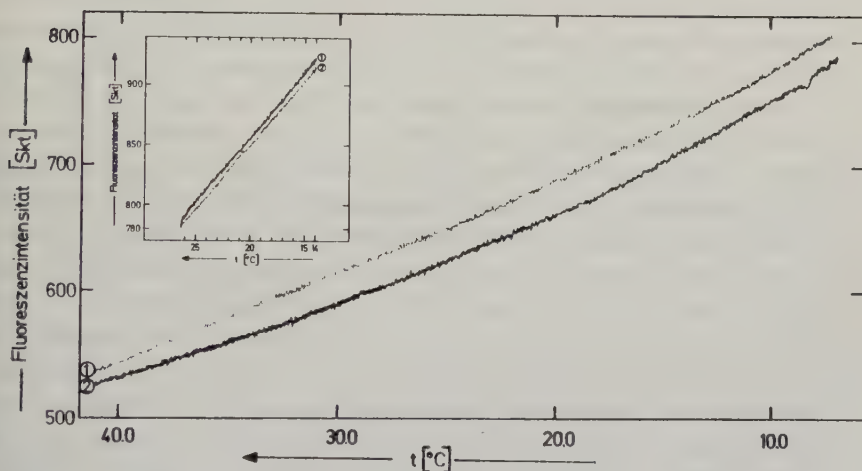


Abb. 35 : Temperaturabhängigkeit der "intrinsic" Proteinfluoreszenz von MOPC 104E IgM

Die experimentellen Einzelheiten sind in B-5.1.4, S.47 gegeben.

- (1) Registrieren der Emission während der Abkühlphase
- (2) Registrieren der Emission während der Aufheizphase

C-4.2 Mikrokalorimetrische Messungen:

Zur Methode der Differential-Scanning-Kalorimetrie:

Die Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC) gestattet, kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich (ΔT) Unterschiede im Verlauf der Wärmekapazität ($\Delta T \cdot \Delta c_p$) zwischen Lösung und Lösungsmittel mit hoher Empfindlichkeit zu messen.

Bei der in der vorliegenden Arbeit benutzten Versuchsanordnung (vgl. Abb. 5, S.49) wird dies dadurch erreicht, daß unter quasi-adiabatischen Bedingungen der Wärmefluß zwischen einer Referenz- und Proben-Zelle bestimmt wird. Das von Barberi und Paillet (19) beschriebene Instrument, das durch Symmetrierung des Meßkopfes (Funck und Hoffmann, 1975) optimiert wurde, zeichnet sich u.a. durch sehr hohe Empfindlichkeit bei nicht zu langen Zeitkonstanten des Wärmeübergangs, kleine Dimensionierung der Zellen und gute adiabatische Abschirmung aus (technische Details siehe B-5.2, S.49). Auf Grund des absolut symmetrischen Aufbaues ist es möglich, Referenz- und Proben-Zelle wahlweise zu vertauschen, um so systematische Fehler, die von der Versuchsanordnung bedingt sind, weitgehend auszuschließen. Es ist möglich, Differential-Thermogramme sowohl bei linear ansteigender als auch absteigender Temperatur zu registrieren. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen leistungsgesteuerten Differential-Scanning-Kalorimetern (Ackermann und Rüterjans, 1964; Privalov et al., 1965; Grubert und Ackermann, 1974; Privalov, 1974; Danforth et al., 1974) ist es mit dem in dieser Arbeit benutzten direkten Wärmeflußkalorimeter möglich, auch exotherme Vorgänge zu registrieren. Allerdings sind Nulllinien-Probleme zu überwinden, was nur durch sehr genaue Symmetrieren des Meßkopfes erreicht werden kann. Eine direkte Absolute messung des Wärmeflusses ist nicht möglich. Gemessen wird die elektromotorische Kraft E , aus der sich mittels der Beziehung $Q = \int k E dt$ die umgesetzte Wärmemenge Q berechnen läßt. Differenzieren ergibt die sogenannte $\dot{Q}$ -Funktion

$$\dot{Q} = dQ/dt = kE,$$

die bei einem linearen Temperaturprogramm ($\Delta t \sim \Delta T$) direkt registriert wird. Für die Berechnung der Änderung in den Wärmeinhalt innerhalb eines bestimmten endlichen Temperaturintervalls

ΔT ($\Delta Q = c_p \cdot \Delta T$) aus der Fläche unter der $\dot{Q}$ -Funktion muß die Konstante k durch elektrische Eichung unter möglichst gleichen experimentellen Bedingungen jedesmal neu bestimmt werden.

Zur Kalorimetrie nach der Methode der abgeglichenen Wärmeimpulse (balanced heat pulse calorimetry, BHPC):

Das Kalorimeter nach Barberi und Paillet (1973) (vgl. auch Abb. 5 S.49) kann gleichzeitig, neben dem Betrieb als DSC (vgl. vorigen Abschnitt) auch zum Vergleich spezifischer Wärmen (Δc_p) bei bestimmten, diskreten Temperaturen nach dem BHPC-Prinzip (Jones et al., 1973; Funck und Hoffmann, 1975a) verwendet werden. Hierbei wird durch kurzfristige Zufuhr von elektrischer Leistung L in Probe-Zelle ($L = L + \Delta L$) und Referenz-Zelle ($L = L - \Delta L$) künstlich ein Temperaturunterschied erzeugt. Temperatenausgleich durch das Multithermoelement äußert sich in einer elektromotorischen Kraft E , die auf dem Schreiberdiagramm registriert wird (vgl. Abb. 36, Puls I).

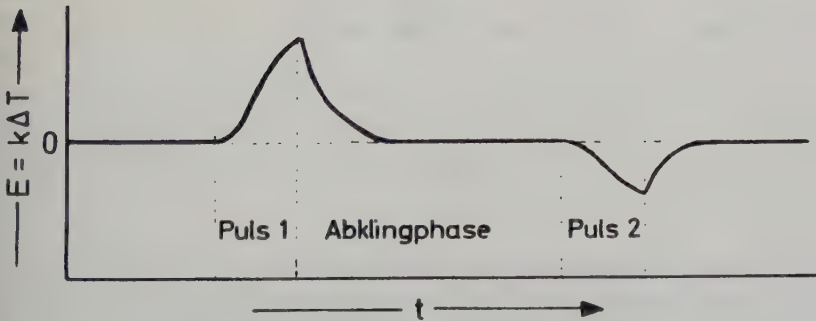


Abb. 36: Schematisches Schreiberdiagramm bei der BHPC

Vertauschen der den Zellen zugeführten Wärmemengen in einem zweiten Puls (II) ermöglicht es, durch Interpolation das theoretische Verhältnis Q_1/Q_2 derjenigen Wärmemengen zu ermitteln, die unter idealen Voraussetzungen beide Zellen gleichmäßig aufheizen würden, d.h. $\Delta T = 0$. Mit

c_{ps} = spezifische Wärme des Lösungsmittels,

m_i = Masse des gelösten Stoffes i,

m_{s_1} = Masse des Lösungsmittels in der Proben-Zelle,

m_{s_2} = Masse des Lösungsmittels in der Referenz-Zelle

und einer durch Eichung zu ermittelnden Apparatekonstanten A gilt dann (Funck und Hoffmann, 1975a):

$$\Delta c_{pi} = \frac{m_{s_2} - m_{s_1}}{m_i} c_{ps} + \frac{m_{s_2} c_{ps}}{m_i A} \cdot \left(\frac{Q_1}{Q_2} - 1 \right)$$

wobei Δc_{pi} der scheinbare Beitrag des gelösten Stoffes i zur spezifischen Wärme der Lösung (c_{pl}) ist ($c_{pl} = c_{ps} + \Delta c_{pi}$). Die Temperaturabhängigkeit von Δc_{pi} läßt sich in einem Diagramm Q_1/Q_2 versus T darstellen.

Ergebnisse aus DSC und BHPC:

Wie aus Abb. 37a zu ersehen ist, zeigt MOPC 104E IgM zwischen 6 und 36°C ein ausgeprägtes Temperaturverhalten, bei dem die Summe aus aufgenommenen und abgegebenen Wärmemengen ΔH (jeweils ca. 190 kJ Mol Bindungsstellen) innerhalb der Fehlergrenzen ($\pm 10\%$) gleich Null ist. Der Kurvenverlauf ließ sich bei mehreren aufeinanderfolgenden Experimenten mit den gleichen Zellenfüllungen sowie bei Wiederholungsexperimenten mit MOPC 104E IgM einer anderen Preparation gut reproduzieren.

Die Wärmeaufnahme zwischen 6 und 36°C geschieht hierbei in verschiedenen Stufen, die durch einen exothermen Bereich (16°C - 19°C) voneinander getrennt sind, während beim Abkühlen eine monotone Wärmeabgabe beobachtet wird (Hysterese). Dieser Befund erwies sich als unabhängig von der Geschwindigkeit des Aufheizens (3°C/h bis 1°C/min).

Ein der Abb. 37a qualitativ entsprechendes Thermogramm für die Aufheizphase wurde mit MOPC 104E IgM nach der BHPC-Methode gefunden (Abb. 37b).

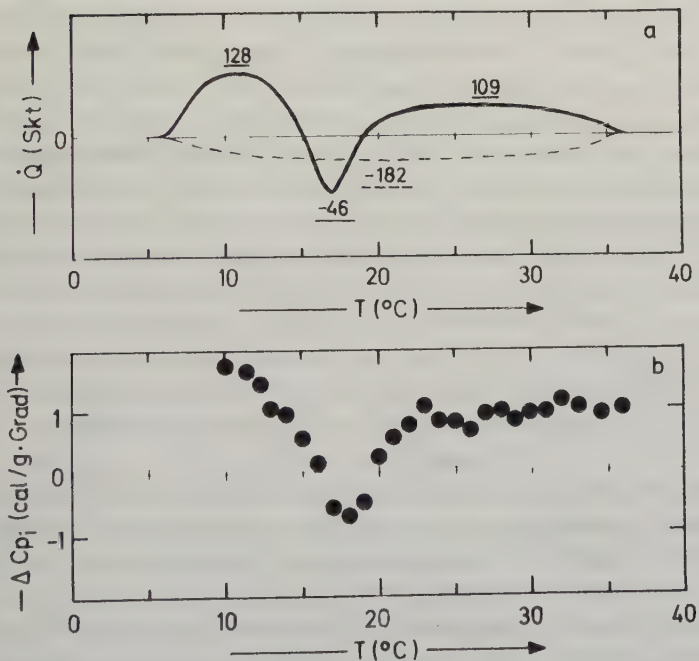


Abb. 37: Thermogramme von MOPC 104E IgM

- Thermogramm aus der DSC (experimentelle Details siehe B-5.2.1, S.50). Die Energiebeträge sind in kcal/Mol Bindungsstellen (MW 90 000) angegeben. (—) Aufheiz- und (---) Abkühlphase.
- Thermogramm aus der BHPC (experimentelle Details siehe B-5.2.2, S.50).

C-4.3 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse:

Das Temperaturverhalten von MOPC 104E IgM wurde unter dem Aspekt, wenn möglich, thermisch induzierte Zustandsänderungen des Proteins nachzuweisen, mit Hilfe optischer und mikrokolorimetrischer Methoden untersucht. Ähnliche Studien an Proteinen (auch an Immunglobulinen), bei denen optische Methoden angewendet wurden, sind in der Literatur beschrieben (Bello, 1970; Demchenko und Zyma, 1975; Izumi und Inoue, 1976; Nicola und Leach, 1976; Troitsky et al., 1971, 1973; Zav'yalov et al., 1970, 1975, 1977, 1977a,b). In einigen dieser Publikationen wurden die Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt der Verteilung von Tryptophan- und Tyrosin-Resten zwischen Lösungsmittel-exponierten und inneren hydrophoben Teilen des Proteins diskutiert (Bello, 1970; Demchenko und Zyma, 1975; Izumi und Inoue, 1976, Nicola und Leach, 1976). Sofern das Verhältnis dieser Anteile konstant bleibt, ist eine lineare Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten von der Temperatur zu erwarten (Cooper, 1974; Nicola und Leach, 1976). Änderungen in der Verteilung der Chromophore hingegen, wie sie auf Grund von Konformationsänderungen auftreten können, sollten sich durch diskrete Abweichungen von der Linearität im Temperaturbereich des Übergangs zu erkennen geben.

Im Hinblick auf diese Kriterien zeigte MOPC 104E IgM keine Veränderungen der Chromophoren-Verteilung im Bereich von 7°C bis 40°C (Abb. 32). Auch durch Anwendung anderer optischer Methoden, wie Messung der Temperaturabhängigkeit des Zirkular-Dichroismus (Abb. 33), der Fluoreszenzintensität (Abb. 35) sowie der optischen Rotation bei 589 nm (Abb. 34) wurden keine Hinweise auf diskrete konformationelle Übergänge erhalten.

Unsere Befunde bei MOPC 104E IgM stehen somit im Gegensatz zu Ergebnissen von Troitsky et al. (1973) und Zav'yalov et al. (1975, 1977) an verschiedenen IgG-Präparationen und einem Bence-Jones-Protein (Zav'yalov et al., 1977a). Hingegen war es Zav'yalov et al. (1975) nicht gelungen, an einem dieser IgG-Proteine den mit optischen Methoden gefundenen Konformationsübergang auch mikrokolorimetrisch nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Mikrokalorimetrie thermisch induzierte Konformationsänderungen nachgewiesen. Die in Abb. 37 gezeigten Thermogramme lassen das Vorliegen von mindestens drei im Gleichgewicht befindlichen Konformeren klar erkennen. Damit ist zumindest eine der wesentlichen Merkmale des allosterischen Modells von Monod et al. (1965) erfüllt. Auf der anderen Seite kann man jedoch nicht ausschließen, daß sich hinter dem kalorimetrisch gewonnenen Kurvenverlauf der Temperaturabhängigkeit von MOPC 104E IgM eine Summe aus nacheinander oder in Kombination auftretender zahlreicher thermodynamischer Einzelzustände verbirgt.

Mehrzustands-Übergänge wurden kürzlich (Freire und Biltonen, 1978) am Beispiel von Phenylalanin-spezifische tRNA durch Anpassung theoretischer Verteilungsfunktionen an mikrokalorimetrisch erhaltenen Daten diskutiert. Das Vorliegen sehr zahlreicher Einzelübergänge würde verständlich machen, daß bei den optischen Untersuchungen (UV, CD, Fluoreszenz und optische Rotation) keine Hinweise auf diskrete Zustandsänderungen erhalten wurden. Ebenfalls würde dazu passen, daß die insgesamt endotherme Strukturänderung von MOPC 104E IgM mit steigender Temperatur (von 6°C - 36°C) mit einer hohen Enthalpieänderung ($2,1 \text{ cal/g} \hat{=} 190 \text{ kcal/Mol Bindungsstellen}$) verbunden ist. Die Größenordnung dieses Enthalpiebetrages gewinnt Bedeutung, wenn man bedenkt, daß die Enthalpieänderung beim Binden von Tetrasaccharid an das Myelomprotein nur 8 kcal pro Mol Bindungsstellen ausmacht.

Eine Aufsummierung zahlreicher Einzeleffekte würde auch helfen, das offensichtliche Auftreten einer exothermen Phase während der Aufheizperiode (vgl. Abb. 37) zu erklären, die scheinbar dem LeChatelier'schen Prinzip zuwiderläuft. Eine mögliche Erklärung bietet sich unter der Annahme an, daß beim Aufheizen bis 14°C das Protein Energie speichert, um dann, bei einer bestimmten Energieschwelle, sprunghaft die überschüssige Energie abzugeben. Dies bedeutet, daß in diesem Bereich das Protein weniger Wärme aufnimmt als das Lösungsmittel, wie dies aus dem negativen "apparenten" ΔC_p in Abb. 37b ebenfalls hervorgeht.

Aus der Analyse der reaktionskinetischen Daten von MOPC 104E IgM, N4-Dns bei 25°C ergab sich für das Isomerisierungsgleichgewicht des ungebundenen Proteins eine Gleichgewichtskonstante von $K_0 = 0,90$ und unter Berücksichtigung der Relaxationsamplituden ein Schätzwert für die Enthalpieänderung $\Delta H_0 = -3,3 \text{ kcal/Mol}$ (s. Tab. 14, S.127).

Interessant erscheint die Frage, welchen Anteil die Isomerisierung mit einem Enthalpiebeitrag dieser Größenordnung an der mikrokalorimetrisch beim Aufheizen von 6°C bis 36°C gemessenen Enthalpieänderung (2,1 cal/g) hat. Unter Verwendung der Van't Hoff-Gleichung ergeben sich aus $K_0(25,3^\circ\text{C}) = 0,9$ und $\Delta H = -3,3 \text{ kcal/Mol Bindungsstellen (MW = 90 000)}$ für die Isomerisierungskonstante bei 6°C und 36°C sowie für die stoffliche Verteilung des Proteins auf die Zustände T_0 und R_0 folgende Werte:

T [°C]	K_0	Molenbruch in Zustand	
		T_0	R_0
6	1,32	0,43	0,57
25,3	0,9	0,53	0,47
36	0,74	0,57	0,43

Tabelle 15: Temperaturabhängigkeit des Isomerisierungsgleichgewichtes von ungebundenem MOPC 104E IgM (s. Text)

Es gehen demnach bei einer Temperaturänderung von 6°C auf 36°C von einem Mol IgM 14 % vom T_0 - in den R_0 -Zustand über. Dies entspricht einer Umwandlungsenthalpie von $\Delta H = -3,3 \cdot 0,14 \text{ kcal/Mol Bindungsstelle}$ oder $\Delta H = -5,1 \text{ mcal/g}$.

Verglichen mit der in der Aufheizphase der mikrokalorimetrischen Messungen über den Temperaturbereich von 6°C bis 36°C bestimmten Gesamt-Umwandlungsenthalpie von $\Delta H = 2,1 \text{ cal/g}$ ist danach der Beitrag der Isomerisierung $T_0 \rightleftharpoons R_0$ sehr gering (nur ca. 0,25 %).

Dadurch wird deutlich, daß die Isomerisierungsenthalpie des freien MOPC 104E IgM mikrokalorimetrisch nicht zu erfassen war.

Andererseits erscheint der Befund, daß beim Erwärmen des Proteins von 6°C auf 36°C temperaturabhängige Prozesse stattfinden, die durch einen vielfach höheren Wärmeübergang charakterisiert sind, als er bei den spezifischen Funktionen des Proteins auftritt, neu und interessant. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Phänomens sind vorgesehen.

D ZUSAMMENFASSUNG

MOPC 104E IgM, ein homogenes Immunglobulin der M-Klasse mit bekannter Spezifität für α -(1-3)-Dextran, wurde nach subcutaner Passage von Plasmacytom MOPC 104E in BALB/c Mäusen produziert. Das sekretierte IgM wurde aus dem Serum mittels Affinitätschromatographie isoliert und mit physikalischen sowie immunchemischen Methoden charakterisiert.

Oligosaccharid-Haptene für MOPC 104E IgM wurden durch saure Partialhydrolyse von α -(1-3)-Glucan (gewonnen aus Mycelium von *Aspergillus niger*) hergestellt und aufgrund ihrer optischen Drehung, ihrer R_f -Werte sowie ihrer Hydrolyseprodukte als Glieder der polymer-homologen α -(1-3)-Oligoglucan-Reihe charakterisiert.

Oligosaccharide wurden entweder direkt (Reduktion mit ^3H -Natriumborhydrid) oder nach Überführung in entsprechende 4-Hydroxyphenyl-Derivate (nach der Chloramin-T-Methode mit ^{125}J) radioaktiv markiert.

Zur Fluoreszenz-Markierung von reduzierenden Oligosacchariden erwies sich Dansylhydrazin als sehr geeignetes Reagenz. Die präparative Darstellung von Dansylhydrazonen (in Ausbeuten von ca. 40 %) ist hier beschrieben. Dansylierte Oligosaccharide ermöglichen Untersuchungen zur Hapten-Antikörper-Reaktion an MOPC 104E IgM mit fluoreszenz-optischen Methoden.

Hapten-Bindungskonstanten von MOPC 104E IgM wurden durch Gleichgewichtsdialysen, Verdrängungs-Gleichgewichtsdialysen sowie - mit den dansylierten Haptenen - durch fluorimetrische Titrationen bestimmt.

Änderungen in den Fluoreszenz-Eigenschaften der Haptene aufgrund der Bindung an MOPC 104E IgM wurden mit spektroskopischen Methoden - insbesondere durch Messen der Linear- und Zirkularpolarisation der Dansylfluoreszenz - untersucht.

Beides, die Analyse von thermodynamischen Bindungsparametern 18 verschiedener Haptene sowie die Ergebnisse aus den fluoreszenz-optischen Untersuchungen der gebundenen, dansylierten Haptene, führte zu einem verfeinerten Bild der Hapten-Bindungsstelle von MOPC 104E IgM: Sie läßt sich als eine enge, ca. 12 Å tiefe Höhle beschreiben, die optimalen Kontakt für eine terminale, nichtreduzierende Nigerosylgruppe bietet. An ihrem Ende erweitert sich diese Höhle zu einer offenen Mulde, in der eine weitere Glucoseeinheit - wenngleich auch mit geringerer Spezifität - gebunden werden kann.

Reaktionskinetische Untersuchungen der Hapten-Antikörper-Reaktion von MOPC 104E IgM mit dansylierten Oligosacchariden wurden mit Hilfe des Temperatursprung-Verfahrens durchgeführt. Es wurden zwei zeitlich entkoppelte Relaxationsprozesse beobachtet, von denen der schnellere der Protein-Ligand-Assoziation (bimolekulare Reaktion) und der langsamere einer Protein-Isomerisierung (monomolekulare Reaktion) zuzuschreiben ist. Die Konzentrationsabhängigkeit von Relaxationszeiten und Amplituden ließ sich mit einem Reaktionsmechanismus erklären, der mit einem allosterischen Verhalten des Proteins in Einklang zu bringen ist.

Die Temperaturabhängigkeit von MOPC 104E IgM (in Abwesenheit von Hapten) wurde mit optischen und kalorimetrischen Methoden untersucht. Den mikrokolorimetrischen Messungen zufolge zeigt das Protein zwischen 6°C und 36°C ein Temperaturverhalten, das durch einen hohen Wärmeübergang (180 kcal/Mol Bindungsstelle) sowie dem Auftreten einer ausgeprägten Hysterese im Verlauf der Wärmeaufnahme und -abgabe beim Erwärmen und Abkühlen charakterisiert ist. Hin- und wieder auf diskrete, thermisch induzierte, konformationelle Übergänge wurden bei MOPC 104E IgM nicht gefunden.

LITERATURVERZEICHNIS:

- Ackermann, Th. und Rüterjans, H., (1964)
Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 68, 850
- Amzel, L.M., Poljak, R.J., Saul, F., Varga, J.M. und Richards, F.
(1974) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 71, 1427
- Ashman, R.F., Kaplan, A.P. und Metzger, H., (1971)
Immunochemistry, 8, 627
- Bacon, J.S.D., Jones, D., Farmer, V.C. und Webley, D.M., (1968)
Biochim.Biophys.Acta 158, 313
- Barberi, P. und Paillet, A., (1973)
B.I.S.T. (Commissariat à l'Energie Atomique) 180, 17
- Barnett, J.E.G., (1972)
in: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler, R.L. und
BeMiller, J.N., eds.) 6, S. 499, Academic Press, New York
- Bates-Smith, E.C. und Westall, R.G., (1950)
Biochim.Biophys.Acta 4, 427
- Beale, D. und Feinstein, A., (1970)
FEBS Lett. 7, 175
- Bello, J., (1970)
Biochemistry 9, 3562
- Berger, A. und Schechter, I., (1970)
Phil.Trans.Roy.Soc.London, Ser. B 257, 249
- Billman, J.H. und McDowell, J.W., (1961)
J.Org.Chem. 26, 1437
- Blatt, Y., (1976)
Master-Thesis, The Weizmann-Institute of Science, Rehovot, IL.
- Blout, E.R. und Stryer, L., (1959)
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 45, 1591
- Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W., und Udenfriend, S., (1973)
Arch.Biochem.Biophys. 155, 213
- Bray, G.A., (1960)
Anal.Biochem. 1, 279
- Brown, J.C. und Koshland, M.E., (1975)
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 72, 5111
- Carson, D. und Weigert, M., (1973)
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 70, 235
- Castellan, G.W., (1963)
Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 67, 898
- Chapius, R.M. und Koshland, M.E., (1974)
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 71, 657
- Chayen, R., Dvir, R., Gould, S. und Harell, A., (1971)
Anal.Biochem. 42, 283

- Chen, R.F., (1967)
Arch.Biochem.Biophys. 120, 609
- Chen, R.F., (1973)
in: Practical Fluorescence, Kap. 12 (Guilboud, G.G., ed.)
Marcel Dekker, New York
- Cervenka, C.H., (1973)
"A Manual of Methods for the Analytical Ultracentrifuge",
Spinco Division of Beckman Instruments, Palo Alto
- Cisar, J., Kabat, E.A., Dorner, M.M. und Liao, J., (1975)
J.Exp.Med. 142, 435
- Cohen, S. und Porter, R.R., (1964)
Advan.Immunol. 4, 305
- Conrad, R.H. und Brand, L., (1968)
Biochemistry 7, 777
- Consden, R., Gordon, A.H. und Martin, A.J.P., (1944)
Biochem.J. 38, 224
- Cooper, A., (1974)
FEBS Lett. 48, 101
- Danforth, R., Krakauer, H. und Sturtevant, J.M., (1966)
Rev.Sci.Instrum. 38, 484
- Davies, D. und Padlan, E.A., (1977)
in: Antibodies in Human Diagnosis and Therapy (E. Haber und
R.M. Krause, eds.) Raven Press, New York, S. 119
- Demchenko, O.P. und Zyma, V.L.. (1975)
Stud.Biophys. 52, 209
- Diem, K. und Lentner, C. (eds.), (1975)
in: Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. ed.,
S. 274 ff., G. Thieme, Stuttgart
- Dorrington, K.J. und Smith, B.R., (1972)
Biochim.Biophys.Acta,263, 70
- Dresser, D.W. und Greaves, M.F., (1973)
in: Handbook of Experimental Immunology (Weir, D.M. ed.) 2.ed.
p.27.25, Blackwell, London
- Du Pasquier, L., (1976)
in: The Immune System (Melchers, F. und Rajewsky, K., eds.)
S. 101, Springer, Heidelberg
- Eckhardt, A.E., Hayes, C.E. and Goldstein, I.J., (1976)
Analy.Biochem. 73, 192
- Edberg, S.C., Bronson, P.M. und van Oss, C.J., (1972)
Immunochemistry 9, 273
- Eigen, M. und De Maeyer L., (1963)
in: Techniques of Organic Chemistry (Friess, S.L., Lewis, E.S.
und Weissberger, A., eds.) 8, Part II, p. 895, Wiley, New York

- Feinstein, A., Munn, E.A. und Richardson, N.E., (1971)
Ann. N.Y. Acad.Sci. 190, 104
- Fletcher, R., (1971)
in: Harwell Subroutine Library, Atomic Energy Research
Establishment, Harwell, GB (Subroutine VB01A)
- Förster, T., (1960a)
in: Discussion of the Faraday Society, 27, 7
- Förster, T., (1960b)
Radiat.Res., Suppl. 2, 326
- Freire, E. und Biltonen, R.L., (1978)
Biopolymers 17, 1257
- French, D. und Wild, G.M., (1953)
J.Amer.Chem.Soc. 75, 2612
- Freudenberg, K. und Blomqvist, G., (1935)
Ber. 68, 2070
- Froese, A. und Schon, A.H., (1975)
Contemp.Topics Mol.Immunol. 4, 23
- Funck, Th. und Hoffmann, S., (1975)
Ulmer Kalorimetrietage, April 1975
- Funck, Th. und Hoffmann, S., (1975a)
Journées de Calorimetrie et d'Analyse Thermique, Grenoble 1975
- Gafni, A., Schlessinger, J. und Steinberg, I.Z., (1973)
Isr.J.Chem. 11, 423
- Galanos, C., Lüderitz, O., Himmelsbach, K., (1969)
Eur.J.Biochem. 8, 332-336
- Geyer, H., (1977)
Dissertation, Universität Freiburg
- Glaudemans, C.P.J., Manjula, B.N., Bennet, L.G., and Bishop, C.T.
(1977) Immunochemistry, 14, 675
- Graef, V., (1970)
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 8, 320
- Grinvald, A. und Steinberg, I.Z., (1974)
Anal.Biochem. 59 583
- Grubert, M. und Ackermann, Th., (1974)
Z.Phys.Chem. 93, 255
- Guggenheim, B., (1970)
Helv.Odont.Acta, 14, Suppl. V, 89
- Harisdangkul, V. und Kabat, E.A., (1972)
J.Immunol., 108, 1232
- Hasegawa, S. und Nordin, J.H., (1969)
J.Biol.Chem. 244, 5460
- Haselkorn, D., Friedman, S., Givol, D. und Pecht, I., (1974)
Biochemistry 13, 2210

- Haustein, D., (1971)
Dissertation Universität Freiburg
- Haustein, D., Himmelsbach, K. und Funck, T., (1977)
Immunochemistry 14, 361
- Himmelsbach, K., Westphal, O. und Teichmann, B., (1971)
Eur.J.Immunol., 1, 106
- Himmelsbach, K., Geyer, H., Hoyer, G. und Schepers, G., (1977)
FEBS-Letters, 75, 154-158
- Hiramoto, R., Ghanta, V.K., McGhee, J.R., Schrohenloher, R., und Hamlin, N.M., (1972) Immunochemistry 9, 1251
- Hirschfeld, J., (1960)
Science Tools 7, 18
- Holowka, D.A. und Cathou, R.E., (1976)
Biochemistry, 15, 3379
- Hsia, J.C. und Piette, L.H., (1969)
Arch.Biochem.Biophys. 129, 296
- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M. und Palm, W., (1976) Nature 264, 415
- Hunter, W.M., (1973)
in: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, ed.) 2. ed.,
S.17.3, Blackwell, Oxford
- Izumi, T. und Inoue, H., (1976)
J.Biochem. 79, 1309
- Jeanes, A., Wise, C.S. und Dimler, R.J., (1951)
Anal.Chem. 23, 415
- Jeanes, A., Haynes, W.C., Wilham, C.A., Rankin, J.C., Melvin, E.H., Austin, M.J., Cluskey, J.E., Fischer, B.E., Tsuchiya, H.M. und Rist, C.E., (1954) J.Amer.Chem.Soc. 76, 5041
- Johnston, I.R., (1965)
Biochem.J. 96, 659
- Jolley, M.E., Rudikoff, S., Potter, M. und Glaudemans, C.P.J., (1973) Biochemistry 12, 3039
- Jolley, M.E. und Glaudemans, C.P.J., (1974)
Carbohydr.Res. 33, 377
- Jolley, M.E., Glaudemans, C.P.J., Rudikoff, S. und Potter, M., (1974) Biochemistry 13, 3179
- Jones, R.W., Knapp, G.S. und Veal, B.W., (1973)
Rev.Sci.Instrum. 44, 807
- Jovin, T., (1975)
in: Concepts in Biochemical Fluorescence (Chen, R.F. und Edelhoch, H. eds.) 1, S. 305, Marcel Dekker Inc. New York
- Kabat, E.A., (1961)
in: Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry (Thomas, C.C., Publisher), Springfield, Ill., 2nd edition

- Kabat, E.A., (1976)
in: Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, 2nd ed.
Holt Rinehart and Winston, New York
- Kanaoka, Y., (1977)
Angew.Chem. 89, 142
- Karush, F., (1962)
Advan.Immunol. 2, 1
- Karush, F., (1976)
Contemp.Topics Mol.Immunol. 5, 217
- Katz, M. und Pappenheimer, A.M. Jr., (1969)
J.Immunol. 103, 491
- Kauzmann, W., (1959)
Advan.Protein Chem. 14, 1
- Kickhöfen, B. und Warth, R., (1968)
J.Chromatogr. 33, 558
- Kickhöfen, B. und Warth, R., (1976)
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 357, 745
- Kirtley, M.E. und Koshland, D.E. Jr., (1972)
in: Meth.Enzymology 26, 578
- Klaus, G.G.B., (1977)
in: B and T Cells in Immune Recognition (Loor, F. and Roelants, G.E., eds.) S. 235, Wiley, London
- Kleinhammer, G., (1972)
Dissertation, Universität Freiburg
- Kleinhammer, G., Himmelsbach, K. und Westphal, O., (1973)
Eur.J.Immunol. 3, 834
- Klotz, I.M., (1953)
in: The Proteins, Vol. I, Part B., (Neurath H. und Bailey, K., eds.)
p. 748 ff., Academic Press, New York
- Koshland, D.E., Nemethy, G. und Filmer, D., (1966)
Biochemistry, 5, 365
- Kuhn, H., (1977)
in: Biophysik (Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H. und Ziegler, H., eds.), S. 187 ff., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Kuhn, R., Desnuelle, P. und Weygandt, F., (1937)
Ber. 70, 1293
- Lämmli, U.K., (1970)
Nature, 227, 680
- Lamchen, M. und Whistler, R.L., (1971)
Carbohydr.Res. 16, 309
- Lancet, D. und Pecht, I., (1976)
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 73, 3549
- Lancet, D., (1978)
Dissertation, The Weizmann-Institute of Science, Rehovot (Israel)

- Lehmann, J., (1976)
in: Chemie der Kohlenhydrate, S. 64 ff., G. Thieme, Stuttgart
- Leon, M.A., Young, N.M. und McIntire, K.R., (1970)
Biochemistry 9, 1023
- Li, Y.H., Chan, L.M., Tyer, L., Moody, R.T., Himmel, C.M. und Hercules, D.M., (1975) J.Amer.Chem.Soc. 97, 3118
- Licht, A., Lancet, D., Schechter, I. und Pecht, I., (1977)
FEBS Lett. 78, 211
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J.,
(1951) J.Biol.Chem. 193, 265
- Marchalonis, J.J., (1976)
Contemp.Topics in Mol. Immunol. 5, 125
- Martin, A.J.P., (1949)
Biochem.Soc.Symp. 3, 4
- Mayers, G.L., Bankert, R.B. und Pressman, D., (1978)
J.Immunol. 120, 1143
- McIntire, K.R., Asofsky, R.M., Potter, M. und Kuff, E.L., (1965)
Science, 160, 361
- Melchers, F. und Andersson, J., (1973)
Transplant. Rev. 14, 76
- Metzger, H., Perlman, R.L. und Edelhoeh, H., (1966)
J.Biol.Chem. 241, 1741
- Metzger, H., (1969)
Amer.J.Med. 47 837
- Metzger, H., (1974)
Advan.Immunol. 18, 169
- Meyer-Delius, M., Mitchison, N.A., Pitt-Rivers, R. und Rude, E.,
(1971) Eur.J.Immunol. 1, 267
- Miller, G.L., (1963)
in: Meth.Carbohydr.Chem., (Whistler, R.L. ed.), Vol. III, S. 134,
Academic Press, New York
- Milstein, C.P., Richardson, N.E., Deverson, E.V. und Feinstein, A.,
(1975) Biochem.J. 151, 615
- Minden, R. und Farr, R., (1973)
in: Handbook of Experimental Immunology (Weir, D.M., ed), 2nd ed.
Blackwell, London, p. 15.2
- Monod, J., Wyman, J. und Changeux, J.P., (1965)
J.Mol.Biol. 12, 88
- Nicola, N.A. und Leach, S.J., (1976)
Int.J.Peptide Prot.Res. 8, 393
- Nisonoff, A. und Pressman, D., (1958a)
J.Immunol. 80, 417
- Nisonoff, A. und Pressman, D., (1958b)
J.Immunol. 81, 126

- Onodera, M., Shiokawa, H., und Takagi, T., (1976)
J.Biochem. 79, 195
- Osborn, M.N., (1963)
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 50, 503
- Painter, T.J., (1960)
Chem.Ind. (London), 1214
- Parker, C.W., Yoo, T.J., Johnson, M.C. und Godt, S.M., (1967)
Biochemistry 6, 3408
- Parker, C.W., (1973)
in: (Weir, D.M., ed.) Handbook of Experimental Immunology, 2nd ed.
p.14.3, Blackwell, London
- Parkhouse, R.M.E., Askonas, B.A. und Dourmashkin, R.R., (1970)
Immunology 18, 575
- Partridge, S.M., (1948)
Biochem.J. 42, 238
- Pazur, J.H., (1970)
in: The Carbohydrates (Pigman, W., Horton, D. und Herp. A., eds)
Vol. IIA, 2nd Edition, Academic Press, New York und London
- Peat, S., Whelan, W.J., und Roberts, J.G., (1956)
J.Chem.Soc. 2258
- Pecht, I., Maron, E., Arnon, R., und Sela, M., (1971)
Eur.J.Biochem. 19, 368
- Pecht, I., Haselkorn, D. und Friedman, S., (1972)
FEBS Lett. 24, 331
- Pecht, I., (1975)
in: Protein-Ligand-Interactions (Sund, H. und Blauer, G., eds.)
S. 356, Walter de Gruyter, Berlin
- Pecht, I., (1976)
in: The Immune System (Melchers, F. und Rajewsky, K., eds.)
p. 41, Springer Verlag, Heidelberg
- Pecht, I. und Lancet, D., (1977)
in: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Vol. 24,
(Pecht, I. und Rigler, R., eds.), S. 306, Springer Verlag,
Heidelberg
- Pfleiderer, W. und Nübel, G., (1969)
Chem.Ber. 93, 1406
- Platt, J.R., (1949)
J.Chem.Phys. 17, 484
- Poljak, R.J., Amzel, L.M. und Phizackerley, R.P., (1976)
Prog.Biophys.Molec.Biol. 31, 67
- Potter, M., (1971)
New Engl. J.Med. 284, 831
- Potter, M., (1972)
Physiol.Rev. 52, 631

- Powell, M.J.D., (1971)
in: Harwell Subroutine Library, Atomic Energy Research
Establishment, Harwell, GB (Subroutine VAO4A)
- Privalov, P.L., Monaselidze, D.R., Mrevlishvili, G.M. und
Magaldadze, V.A., (1965) Soviet Physics JEPT 20, 1393
- Privalov, P.L., (1974)
FEBS Lett. 40, S 140
- Putnam, F.W., Florent, G., Paul, C., Shinoda, T. und Shimizu, A.,
(1973) Science 182, 287
- Putnam, F.W., (1977)
in: The Plasma Proteins, Vol. III, 2nd Ed., p. 24, Academic Press,
New York
- Reese, E.T. und Mandels, M., (1964)
Can.J.Microbiol. 10, 103
- Reese, E.T., Maguire, A. und Parrish, F.W., (1972)
Proc. IV IFS: Ferment.Technol.Today 735
- Riesen, W., Rudikoff, S., Oriol, R. und Potter, M., (1975)
Biochemistry, 14, 1052
- Rigler, R., Rabl, K.R., und Jovin, T.M., (1974)
Rev.Sci.Instrum. 45, 580
- Rosemund, K.W. und Pfankuch, E., (1923)
Ber. 56, 2258
- Ruckel, E.R. und Schuerch, C., (1966)
J.Amer.Chem. Soc. 88, 2605
- Rüchel, R., Mesecke, S., Wolfrum, D.I., und Neuhoff, V., (1973)
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 354, 1351
- Sanderson, C.J. und Wilson, D.V., (1971)
Immunochemistry 8, 163
- Scatchard, G., (1949)
Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660
- Schaffer, R. und Isbell, H.S., (1963)
in: Methods in Carbohydr.Chemistry (Whistler, R.L. u. Wolfrom,
M.L., eds.) Vol. 2, S. 11, Academic Press, New York
- Schechter, I., (1972)
Ann. N.Y. Acad.Sci. 190, 394
- Schepers, G., Blatt, Y., Himmelsbach, K. und Pecht, I., (1978)
Biochemistry, 17, 2239
- Schlessinger, J., Steinberg, I.Z. und Pecht, I., (1974)
J.Mol.Biol. 87, 725
- Schlessinger, J., Roche, R.S. und Steinberg, I.Z., (1975)
Biochemistry 14, 255
- Segal, D.M., Padlan, E.A., Cohen, G.H., Rudikoff, S., Potter, M.
und Davies, D.R., (1974) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 71, 4298

- Seiler, N. und Wiechmann, M., (1966)
Fresenius Z.Anal.Chem. 220, 109
- Seiler, N., (1967)
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 348, 601
- Seiler, N., Kamenikova, L. und Werner, G., (1969)
Collect.Czech.Chem.Comm. 34, 719
- Seiler, N. und Wiechmann, M. (1970)
in: Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods,
(Niederwieser, A. und Pataki, G., eds.) 1, 94, Ann Arbor-
Humphrey, Ann Arbor
- Sharon, N. und Chipman, D.M., (1969)
Science 165, 454
- Shinitzky, M., (1974)
Isr.J.Chem. 12, 879
- Sips, R., (1949)
J.Chem.Phys. 16, 490
- Staněk, J., Černý, M., Kocourek, J. und Pacák, J., (1963)
The Monosaccharides, S. 527, Academic Press, New York
- Stahl, E., (1967)
Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag, Berlin, S. 825
- Steinberg, I.Z. und Gafni, A., (1972)
Rev.Sci.Instr. 43, 409
- Steinberg, I.Z., (1975)
in: Concepts in Biochemical Fluorescence, (Chen, R.F. und
Edelhoc, H., eds.) 1, 79, Marcel Dekker, New York
- Steiner, R.F. und Edelhoc, H., (1962)
Chem.Rev. 62, 457
- Streefkerk, D.G. und Glaudemans, C.P.J., (1977)
Biochemistry, 16, 3760
- Teichmann, B., Himmelsbach, K. und Westphal, O., (1971)
J.prakt.Chem. 313, 861
- Thoma, J.A. and French, D., (1957)
Anal.Chem. 29, 1645
- Thusius, D., (1975)
in: Chemical and Biological Applications of Relaxation Spectrometry
(Wyn-Jones, E., ed.) Reidel, Dordrecht, NL
- Tolleshaug, H. und Hannestad, K., (1975)
Immunochemistry 12, 173
- Troitsky, G.V., Zav'yalov, V.P. und Kiryukhin, I.F., (1971)
Biokhimiya 36, 1107
- Troitsky, G.V., Zav'yalov, V.P. und Kiryukhin, I.F., (1973)
Biochim.Biophys.Acta 322, 53
- Tumerman, L.A., Nezhlin, R.S. und Zagayansky, Y.A., (1972)
FEBS Lett. 19, 290

- Tung, K.K. und Nordin, J.H., (1968)
Biochim.Biophys.Acta 158, 154
- Tung, K.K. und Nordin, J.H., (1970)
Anal.Biochem. 38, 164
- Turvey, J.R. und Whelan, W.J., (1957)
Biochem.J. 67, 49
- Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W.
und Weigele, M., (1972) Science 178, 871
- Vitetta, E.S. und Uhr, J.W., (1975)
Science, 189, 964
- Vuk-Pavlović, S., Blatt, Y., Glaudemans, C.P.J., Lancet, D. und
Pecht, I., (1978) Biophys.J., in press
- Watanabe, S., Barnikol, H.U., Bertram, J., Horn, J. und
Hilschmann, N., (1973) Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 354, 1505
- Weber, G., (1952)
Biochem. J. 51, 155
- Weber, G., (1953)
Advan.Proteins Chem. 8, 415
- Weber, G. und Laurence, D.J.R., (1954)
Biochem.J., 56, (1954)XXXI
- Weber G. und Bablouzian, B., (1966)
J.Biol.Chem. 241, 2558
- Weber, P. und Hof, L., (1975)
Biochem.Biophys.Res.Com. 65, 1298
- Weigele, M., DeBernardo, S.L., Tengi, J.P. und Leimgruber, W.,
(1972) J.Amer.Chem.Soc. 94, 5927
- Westphal, O., Feier, H., Lüderitz, O. und Fromme, I., (1954)
Biochem.Z. 326, 139
- Whelan, W.J., Bailey, J.M., und Roberts, P.J.P., (1953)
J.Chem.Soc., 1293
- Whistler, R.L. und Durso, D.F., (1950)
J.Amer.Chem.Soc. 72, 677
- Wiegandt, H. und Ziegler, W., (1974)
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 355, 11
- Willstätter, R. und Schudel, G., (1918)
Ber. 51, 780
- Wolf from, M.L. und Thompson, A., (1963)
in: Methods in Carbohydr.Chemistry (Whistler, R.L. und
Wolf from, M.L., eds.) 2, 65, Academic Press, New York und
London
- Yguerabide, J., Epstein, H.F. und Stryer, L., (1970)
J.Mol.Biol. 51, 573

- Young, N.M., Jocius, I.B. und Leon, M.A., (1971)
Biochemistry 10, 3457
- Zagyansky, Y.A., Tumerman, L.A. und Egorov, A.M., (1972)
Immunochemistry 9, 91
- Zav'yalov, V.P., Kiryukhin, I.F. und Troitsky, G.V., (1970)
Molekulyarnya Biologya 4, 655
- Zav'yalov, V.P., Troitsky, G.V., Demchenko, A.P. und Generalov,
I.V., (1975) Biochim.Biophys.Acta 386, 155
- Zav'yalov, V.P., Demchenko, A.P., Suchomudrenko, A.G. und
Troitsky, G.V., (1977) Biochim.Biophys.Acta 491, 7
- Zav'yalov, V.P., Troitsky, G.V., Khechnashvili, N.N. und
Privalov, P.L., (1977a) Biochim.Biophys.Acta 492, 102
- Zav'yalov, V.P., Abramov, V.M., Skvortzov, V.G. und Troitsky, G.
(1977b) Biochim.Biophys.Acta 493, 359
- Zinner, H., Brenken, H., Braun, W., Falk, I., Fechtner, E. und
Hähner, E., (1959) Ann.Chem. 622, 133

Lebenslauf:

Name: Georg Schepers

Geburtstag: 18. Oktober 1946

Geburtsort: Aachen

Name der Eltern: Josef Schepers und Ehefrau Gertrud, geb. Panzner

Verheiratet mit Felizitas Schepers, geb. Regnat, seit
21. Dezember 1973.

Ein Kind, Marianne Schepers, geboren 6. Juli 1976.

Bildungsgang: 1953 - 1966 Volksschule und Gymnasium
in Aachen

1966 - 1970 Chemiestudium an der Technischen
Hochschule Aachen

1970 - 1973 Chemiestudium an der Universität
Freiburg

1973 - 1974 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut
für Immunbiologie in Freiburg unter
der Leitung von Prof. Dr. O. Westphal
und Dr. K. Himmelspach

1974 - 1978 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut
für Immunbiologie in Freiburg (bei
Prof. Dr. O. Westphal und Dr. K.
Himmelspach). Teile der Doktorarbeit
wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Th.
Funck am Max-Planck-Institut für bio-
physikalische Chemie in Göttingen
sowie am Weizmann-Institut in Reho-
vot/Israel bei Prof. Dr. I. Pecht
durchgeführt.

Roland Gaggstatter · Offsetdruck KG
7800 Freiburg · Rehlingstr. 2 · Tel. (07 61) 733 06

